

DIEGO SOARES AZEVEDO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE
ACTINA EM *Aedes Aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

DIEGO SOARES AZEVEDO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE
ACTINA EM *Aedes Aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth de Lara Capurro Guimarães

Versão corrigida. A versão original eletrônica se encontra disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Azevedo, Diego Soares.

Caracterização do perfil de expressão de actina em *Aedes aegypti* /
Diego Soares Azevedo. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de
concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de
pesquisa: Expressão gênica de mosquitos.

Versão do título para o inglês: Characterization of actin expression
profile in *Aedes aegypti*.

1. *Aedes aegypti* 2. Actina 3. Perfil de expressão 4. Expressão
gênica 5. Genes constitutivos I. Guimarães, Profa. Dra. Margareth
de Lara Capurro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB047/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Diego Soares Azevedo.

Título da Dissertação: Caracterização do perfil de expressão de actina em *Aedes aegypti*.

Orientador(a): Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **189** nas fls. **115** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Margareth de Lara Capurro-Guimarães**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Caracterização do perfil de expressão de actina em Aedes aegypti*" do qual participam o(s) aluno(s) **Diego Soares Azevedo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **22.12.2011, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 13 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho a toda minha amada família, em especial a meu pai, Mauro, a minha irmã, Priscilla, a minha avó, Francisca, e às minhas tias Selma e Sueli, por me apoiarem há todo o momento, por sempre acreditarem em mim e por me amarem de forma verdadeira e incondicional.
Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, por me dar força, sabedoria, saúde e orientação para a realização deste trabalho.
- Ao meu querido e eterno tio e amigo, Álvaro, sem ajuda e incentivo não seria possível à chegada até aqui. Obrigado pelo apóio financeiro e mais que isso, por me incentivar a vir pra São Paulo, por acreditar sempre em mim, pelo amor, cuidado e carinho. Obrigado de coração!
- Aos meus amados amigos, Diego, Wellygton, Wesley e Rodrigo.
- A toda a equipe do laboratório de mosquitos geneticamente modificados, especialmente ao Dr. André pelo apoio e conduta.
- A professora e orientadora Dra.Margareth Capurro, pela orientação e oportunidade de aprendizado e crescimento acadêmico, por acreditar em mim e me abrir as portas do mundo científico.
- A Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

AZEVEDO, D. S. **Caracterização do perfil de expressão de actina em *Aedes aegypti***. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno–Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Entender a biologia molecular básica de insetos vetores pode contribuir para a elaboração de formas de combate ao vetor da doença. Nesse contexto nosso estudo se caracterizou em descrever o perfil de expressão de nove genes de actina presentes no genoma do mosquito *Aedes aegypti*. Através de sequências do DNA complementar (cDNA) disponibilizados em bancos de dados, foram realizadas construções de iniciadores específicos para cada gene de actina. Primeiramente experimentos de RT-PCR foram feitos para a obtenção dos perfis transcricionais semi-quantitativos de cada gene de actina, usando os iniciadores construídos. Observamos a expressão constitutiva de sete genes de actina, dos quais dois já foram descritos em trabalhos anteriores (AeAct-1 e AeAct-2) e a expressão estágio-específica dos outros dois genes, AeAct-3 para machos e AeAct-4 para fêmeas, também já descritas na literatura. Após a obtenção dos perfis transcricionais semi-quantitativos de todos os nove genes de actina, nós geramos também os perfis transcricionais quantitativos desses genes usando a técnica de qRT-PCR. Os perfis obtidos foram também semelhantes aos já descritos na literatura para os quatro primeiros genes de actina. Observamos o acúmulo do número de transcritos em todos os intervalos analisados para todos os genes, embora houvesse intervalos onde esses números se apresentassem muito baixos. Os genes que se apresentaram com maiores picos de indução foram AeAct-4 e AeAct-3, descritos como genes de expressões específicas. E os genes que apresentaram menores picos de indução foram os genes AeAct-1 e AAEL005964. Os picos de indução para todos os genes se encontravam sempre nas formas imaturas do mosquito, principalmente na fase de pupa. Essa característica possivelmente deve-se ao fato da actina ser uma proteína estrutural, justificando a alta transcrição em larvas tardias e principalmente pupas, fase onde ocorre a metamorfose completa do inseto através de uma reestruturação tecidual. Todos os perfis transcricionais obtidos nesse trabalho nos mostra um panorama amplo do comportamento desses genes de actina, embora nos leve a muitas especulações quanto à função de cada actina. Um estudo mais direcionado é necessário para um conhecimento mais profundo da função específica de cada actina. Este estudo descreve o perfil de expressão de cinco genes de actina ainda não relatados na literatura.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Actina. Perfil de Expressão. Expressão Gênica. Genes Constitutivos.

ABSTRACT

AZEVEDO, D. S. **Characterization of actin expression profile in *Aedes aegypti***. 2014. 89 p. Masters thesis (Biology of Pathogen Relationship -Host) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Understanding the basic molecular biology of insect vectors can contribute to the development of ways to combat the disease vector. In this context, our study was characterized to describe the expression profile of nine actin genes present in the genome of *Aedes aegypti*. Through sequences of complementary DNA (cDNA) available in databases, construction of specific primers for each gene actin was performed. First experiments of RT-PCR were made to obtain semi-quantitative transcriptional profiles of each actin gene using the primers constructed. We observed the constitutive expression of seven actin genes, two of which have been described in previous studies (AeAct AeAct-1 and-2) and the expression of stage-specific of two other genes, AeAct-3 for males and AeAct-4 for females, which also already described in the literature. After obtaining the semi-quantitative transcriptional profiles of all nine genes of actin, we also generate quantitative transcriptional profiles of those genes using qRT-PCR technique. The profiles obtained were similar to those reported in the literature for the first four actin genes. We observed the accumulation of the number of transcripts in all analyzed intervals for all genes, although there were intervals where these numbers come forward very low. The genes that presented with major peaks of induction were AeAct-4 and AeAct-3 and reported as expression of specific genes. And genes that showed minor peaks of induction were AeAct and AAEL005964-1. The peaks of induction for all genes always were found in immature mosquito, mainly in the pupa stage. This characteristic is possibly due to the fact that actin is a structural protein, justifying the high transcription in late larvae and mainly pupae stage where complete metamorphosis of insect occurs through a tissue restructuring. All transcriptional profiles obtained in this work shows us a broad overview of the behavior of these genes actin, although it takes us to many speculations about the function of each actin. This study describes the expression profile of five actin genes that have not yet reported in the literature.

Keywords: *Aedes aegypti*. Actin. Expression Profiling. Gene Expression. Constitutive Genes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação de três espécies de mosquitos vetores de aegentes causadores de doenças em humanos, pertencentes a família *Culicidae*.....18
- Figura 2** – Áreas infestadas com mosquitos *Aedes Aegypti* e áreas com dengue epidêmica 19
- Figura 3** – Fêmeas de *Aedes aegypti* durante e após o processo de hematofagia. .20
- Figura 4** – Mapa do Brasil mostrando nível de risco de dengue por estado21
- Figura 5** – Ciclo de vida holometábolo do mosquito *Aedes aegypti*.22
- Figura 6** – Localização dos genes de actina de *Aedes aegypti* dispostos em contig.46
- Figura 7** – Alinhamento de fragmentos dos cDNAs dos genes de actina (Região ORF) mostrando a grande diferença entre eles.49
- Figura 8** – Gel de agarose 1% mostrando os fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados (região ORF) em DNA genômico.....55
- Figura 9** – Gel de agarose 1,2% dos produtos da digestão do DNA de plasmídeos.55
- Figura 10** – Gel de agarose 1,2% dos produtos da PCR controle.....56
- Figura 11** – Gel de agarose 1% mostrando a amplificação de fragmentos para a confirmação da integridade dos cDNAs57
- Figura 12** – Perfil de expressão de actina em *Aedes aegypti*.....58
- Figura 13** – Alinhamento de fragmento dos cDNAs dos genes de actina na região 3'UTR mostrando a grande diferença na sequência nucleotica59

Figura 14 – Gel de agarose 1% mostrando os fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados.....	60
Figura 15 –Gel de agarose 1,2% dos produtos de digestão do DNA de plasmídeos.	61
Figura 16 – Gel de agarose 1% mostrando os plasmídeos linearizados onde foram clonados os genes de actina para geração das curvas-padrão gene específicas.....	62
Figura 17 – Exemplo de quantificação do número de cópias para cada gene estudado através da técnica de RT-PCR em tempo real.	63
Figura 18 – Exemplo de curvas de dissociação obtidas nos experimentos de quantificação dos genes analisados.....	64
Figura 19 – Quantificação absoluta do acúmulo de transcritos do gene AAEL009496-S7 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	66
Figura 20 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL001928 (AeAct-1) por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	68
Figura 21 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL001673 (AeAct-2) por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	69
Figura 22 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL001951 (AeAct-3) por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	70
Figura 23 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL009451 (AeAct-4) por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	71

Figura 24 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL004616 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	72
Figura 25 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL005961 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	73
Figura 26 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL005964 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	74
Figura 27 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL004631 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	75
Figura 28 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL011197 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	76
Figura 29 — Painel geral da quantificação absoluta dos transcritos dos nove genes de actina em <i>Aedes aegypti</i> por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do mosquito	77
Figura 30 – Acúmulo do número de transcritos dos genes de actina ao longo do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Iniciadores utilizados nos experimentos de RT-PCR e qRT-PCR para amplificação dos genes RP49, H2B e S7, servindo como controles positivos. 30
- Tabela 2-** Oligonucleotídeos iniciadores sintetizados especificamente para cada gene de actina em *Aedes aegypti* para os experimentos de RT-PCR. 31
- Tabela 3-** Oligonucleotídeos iniciadores desenhados na região não codificante (3'UTR) especificamente para cada gene de actina em *Aedes aegypti* para os experimentos de qRT-PCR. 32
- Tabela 4 –** Tamanho da região codificante e número de exons e introns de nove genes de actina em *Aedes aegypti* anotados no VectoBase. 44
- Tabela 5 –** Legenda dos graficos de número 20 á 29. 67
- Tabela 6 –** Ranking do acúmulo do número de transcritos dos genes de actina em *Aedes aegypti* em ordem decrescente com os respectivos picos de indução.....78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

DEPC – dietil-pirocarbonato

DEN – vírus dengue

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxirribonucleosídeo trifosfato

DTT - dietiltreitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

kb – kilobase

M – Molar

mL – mililitro

mM – milimolar

nL – nanolitro

pb – par de bases

PBS – salina tamponada com fosfato

PCR – reação em cadeia da polimerase

p/v - porcentagem peso-volume

q - quantitativo

RNA – ácido ribonucléico

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

SDS – duodecil sulfato de sódio

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato-EDTA

TE – Tris-EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Mosquitos – aspectos gerais	17
1.2 <i>Aedes aegypti</i>	29
1.3 Actina	23
2 OBJETIVO	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Colônia e manutenção de <i>Aedes aegypti</i> em insetário	28
3.2 Análises <i>in silico</i>	29
3.3 Síntese de oligonucleotídeos iniciadores	29
3.3.1 <i>Controles endógenos (genes normalizadores)</i>	29
3.3.2 <i>Construção de pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para 9 genes de actina em <i>Aedes aegypti</i></i>	30
3.4 Extração de ácidos nucleicos	32
3.4.1 <i>Extração de DNA genômico</i>	32
3.4.2 <i>Extração de RNA total</i>	33
3.5 Eletroforese de ácidos nucleicos em gel	34
3.5.1 <i>Eletroforese de DNA</i>	34
3.5.2 <i>Eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante</i>	35
3.6 Amplificação de DNA	35
3.7 Amplificação e análise temporal de perfil de transcrição por RT-PCR	36
3.7.1 <i>Quantificação de RNA total</i>	36
3.7.2 <i>Tratamento de RNA total com DNase</i>	36

3.7.3 Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA).....	37
3.7.4 PCR (reação da cadeia da polimerase) utilizando moldes de cDNA.....	37
3.8 RT-PCR em tempo real.....	38
3.8.1 Preparação do DNA de plasmídeos e geração das curvas- padrão.....	38
3.8.2 Quantificação dos transcritos	38
3.9 Análise estatística dos experimentos.....	39
3.10 Bactérias utilizadas e protocolo de preparação	39
3.10.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) e genótipos	39
3.10.2 Preparação de bactérias eletrocompetentes	40
3.10.3 Transformação de bactérias eletrocompetentes	40
3.10.4 Preparação de bactérias quimiocompetentes	40
3.10.5 Transformação de bactérias quimiocompetentes.....	41
3.11 Extração e purificação de DNA de plasmídeo	41
3.12 Clivagem de DNA de plasmídeo com endonucleases.....	42
3.13 Ligação de fragmentos de DNA (insertos) em vetores	42
3.14 Sequenciamento de DNA.....	42
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Análises <i>in silico</i>	44
4.2 Construção de pares de oligonucleotídeos iniciadores na região ORF específicos para 9 genes de actina em <i>Aedes aegypti</i>	47
4.3 Amplificação genômica de fragmentos dos genes candidatos - oligonucleotídeos iniciadores desenhados na região traduzida (ORF)	54
4.4 Confirmação do tratamento de RNA total com DNase	56
4.5 Confirmação da integridade dos cDNAs (DNA complementar) nas diversas fases do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	56

4.6	Cracterização semi-quantitativa temporal dos perfis transcricionais dos genes de actina	57
4.7	Análises <i>in sílico</i> das regioes não traduzidas (UTR).....	59
4.8	Amplificações genômicas de fragmentos dos genes candidados - oligonucleotídeos iniciadores desenhados na região não traduzida (3'UTR) ...	60
4.9	Análises quantitativas do acúmulo de transcritos dos genes de actina de <i>Aedes aegypti</i>.....	60
4.9.1	<i>Clonagem e obtenção de DNA de plasmídeos para elaboração de curvas-padrão</i>	61
4.9.2	<i>Perfis quantitativos de transcrição dos genes de actina.....</i>	63
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mosquitos- aspectos gerais

Os mosquitos são insetos dípteros, pertencentes à Família monofilética Culicidae, conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carapanãs (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Esses insetos pertencem à ordem díptera, sendo representados por 3531 espécies filogeneticamente divididas em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae (HARBACH, 2007, 2011).

Esses dípteros são encontrados em grande abundância nas regiões subtropicais do planeta, com uma grande biodiversidade na região do equador, embora estejam presentes também além dos trópicos em uma menor diversidade (FANG, 2010).

As três primeiras espécies de mosquito foram descritas em meados do século XVIII, e alguns aspectos gerais de seu ciclo biológico também foram então conhecidos. A essa altura, e por muitos anos, pensava-se que a única inconveniência desses insetos era o incômodo causado por sua picada. Porém, foi somente nas últimas décadas do século XIX, quando se descobriu que a filariose bancroftiana e a malária são transmitidas pelos mosquitos, que os cientistas passaram ao estudo mais detalhado de sua biologia e sistemática (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A família Culicidae está entre as mais bem estudadas dos dípteros. Uma das principais razões para este interesse é a hematofagia praticada pelas fêmeas das espécies que dependem dos nutrientes contidos no sangue para o desenvolvimento dos embriões. Este hábito as transforma em vetores de diversos agentes infecciosos causadores de doenças debilitantes e muitas vezes fatais. Isto ocorre porque o mosquito se infecta ao ingerir o sangue de animais ou indivíduos infectados com o agente e, a seguir o transmite a novos doadores de sangue sadios através de seu comportamento hematófago (REY, 2002). No caso de mosquitos transmissores de arbovírus, é ainda possível que esses adquiram os patógenos a partir de sua progenitora, através de transmissão transovariana (ROSEN et al., 1993).

Cerca de 150 espécies agrupadas na família *Culicidae*, mais especificamente pertencentes aos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (Figura 1), são os vetores de agentes etiológicos causadores de doenças mais importantes e estudadas dessa

família, correspondendo não mais que 4% do total das espécies da família *Culicidae* (HARBACH et al., 2007). É então de grande interesse da comunidade científica e órgãos relacionados a controle de doenças um estudo cada vez mais aprofundado da biologia desses dípteros pertencentes à família *Culicidae*.

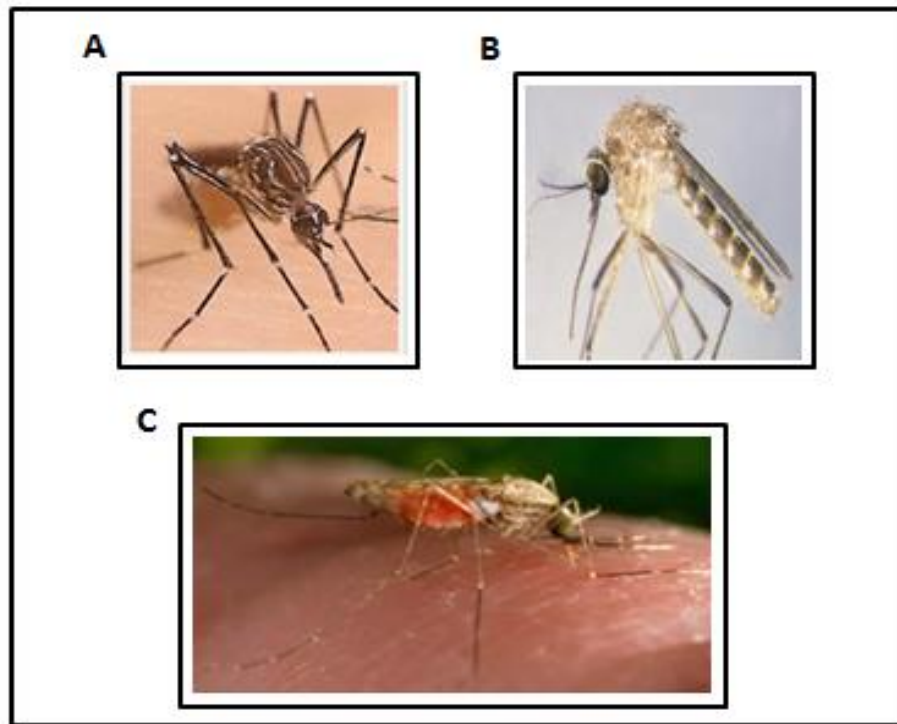


Figura 1 – Representação de três espécies de mosquitos vetores de agentes causadores de doenças em humanos, pertencentes à família *Culicidae*.

- A. *Aedes aegypti*, vetor da dengue e febre amarela urbana.
- B. *Culex quinquefasciatus*, vetor da filariose.
- C. *Anopheles gambiae*, vetor da malária.

FONTE: Center for Disease Control and Prevention (2014).

1.2 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é um mosquito de origem africana que transmite além da dengue a febre amarela em áreas urbanas. Este mosquito acompanhou o homem durante suas migrações pelo mundo, permanecendo onde as alterações antrópicas propiciaram sua proliferação (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). A expansão da distribuição geográfica desta espécie relaciona-se inicialmente ao crescimento das atividades comerciais nos séculos XVII e XVIII, fato que contribuiu para a dispersão passiva deste mosquito (GUBLER, 2004). Hoje a distribuição desta espécie inclui regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (Figura 2). As mudanças demográficas após intenso fluxo migratório rural-urbano nos países subdesenvolvidos após o fim da segunda guerra mundial geraram processo desordenado de urbanização. A infra-estrutura e saneamento básico deficientes nestes ambientes modernos fornecem condições adequadas para a infestação do mosquito (TAUIL, 2001).

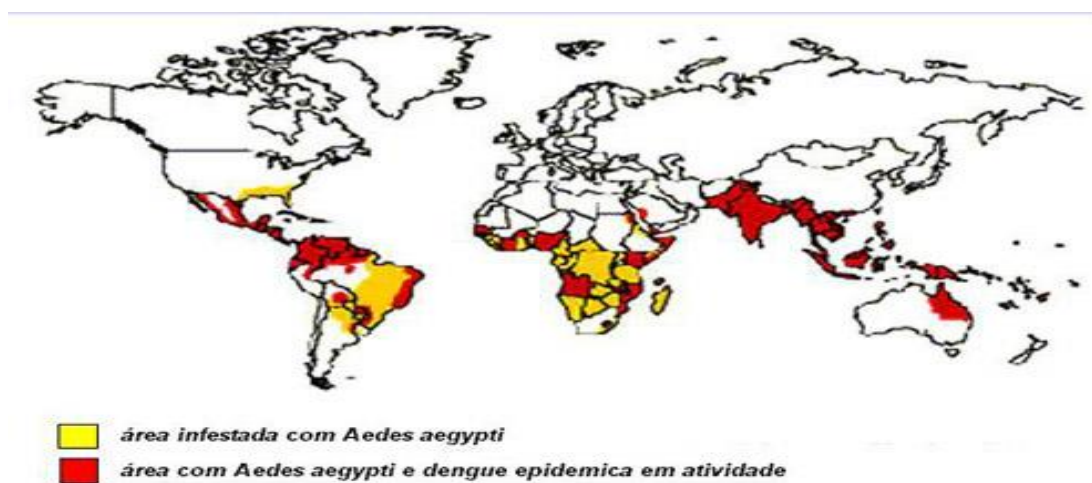


Figura 2 – Áreas infestadas com o mosquito *Aedes aegypti* e áreas com dengue epidêmica.

FONTE: Instituto Virtual da Dengue do Rio de Janeiro (2013).

A forma adulta do mosquito *Aedes aegypti* é alada, apresentando listras e manchas brancas ao longo do corpo e coloração escura (Figura 3), além de uma ornamentação em forma de lira na região do escudo, característica facilmente identificável nesta espécie. Trata-se de um mosquito de hábitos diurnos, atropofílico e que está adaptado a viver em ambientes urbanos, sobretudo em grandes cidades

com aglomerações populacionais. Este mosquito encontra em ambientes residenciais uma variedade de criadouros artificiais para o desenvolvimento de suas formas imaturas e as fêmeas possuem preferência em realizar a alimentação sanguínea em humanos. Estes fatores biológicos e comportamentais torna o mosquito *Aedes aegypti* o culicídeo mais fortemente associado ao homem (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; NATAL, 2002; REY, 2002; TAUIL, 2001).

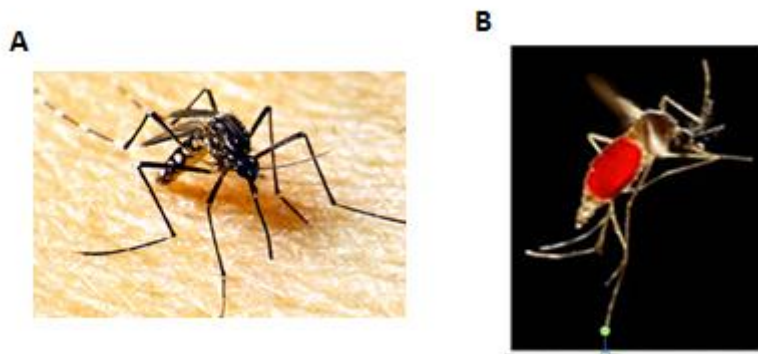


Figura 3 - Fêmeas de *Aedes aegypti* durante e após o processo de hematofagia.

A. Fêmea de *Aedes aegypti* fazendo repasto sanguíneo.

B. Fêmea de *Aedes aegypti* após o processo de hematofagia, com marcante alteração morfológica no abdômen.

FONTE: Center for Disease Control and Prevention (2011).

No Brasil, o *Aedes aegypti* foi introduzido no período colonial através do tráfico negreiro a partir do Senegal e foi o responsável por sucessivas epidemias de febre amarela. Isto levou os governos estaduais a implementar campanhas de combate ao *Aedes aegypti* que, em 1931, foram estendidas a todo território nacional pelo governo brasileiro com o auxílio da Fundação Rockefeller. Esta campanha nacional visava eliminar as formas aquáticas do vetor com o emprego de petróleo. Em 1940 foi proposta a erradicação do *Aedes aegypti*, mas somente em 1947 foi adotado o emprego do dcloro-difenil-tricloroetano (DDT) como método de combate (BRASIL, 2001). Estes programas levaram o governo a considerar o *Aedes aegypti* erradicado do Brasil no ano de 1955. Em 1967, esta espécie voltou a ser encontrada na cidade de Belém e outros 23 municípios do Pará. Porém em 1973, o vetor foi novamente considerado erradicado do país até 1976, quando houve nova introdução na cidade de Salvador-Bahia (BRASIL, 2001). Hoje a presença do mosquito é

registrada em quase todos os estados brasileiros aumentando assim o risco de dengue no país (Figura 4).

Mapa de risco da dengue

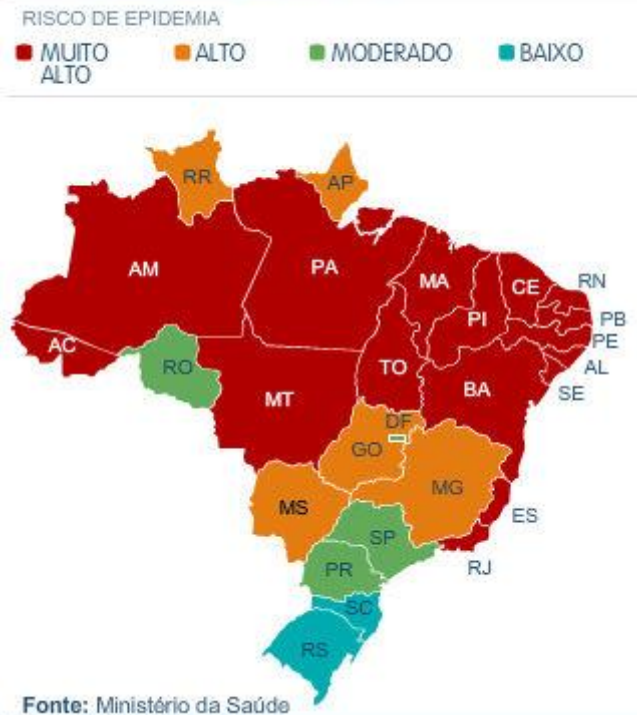


Figura 4 - Mapa do Brasil mostrando nível de risco da dengue por Estado
Fonte: Brasil (2010).

Aedes aegypti é um mosquito que utiliza preferencialmente água limpa para colocar seus ovos, os quais tem alta capacidade de resistir à dissecação, onde os embriões se mantêm viáveis na ausência de água por até 450 dias. O ciclo de vida dura aproximadamente 15 dias (Figura 5). O período larval dura aproximadamente de 7 a 9 dias, passando por 4 estádios (L1 a L4). O estágio de pupa dura de 1 a 2 dias, de onde emergem os adultos (machos e fêmeas). Após a emergência dos adultos, as fêmeas podem viver aproximadamente 50 dias e os machos de 20 a 30 dias, dependendo das condições de temperatura e umidade. Fêmeas adultas necessitam da alimentação sanguínea para a obtenção dos nutrientes necessários para a produção e maturação dos ovos (processo de vitelogênese). As fêmeas estão aptas a oviposição 72 horas após cada repasto sanguíneo, e ovipõem em média 100 ovos por ciclo gonadotrófico (FORATINNI, 2002).

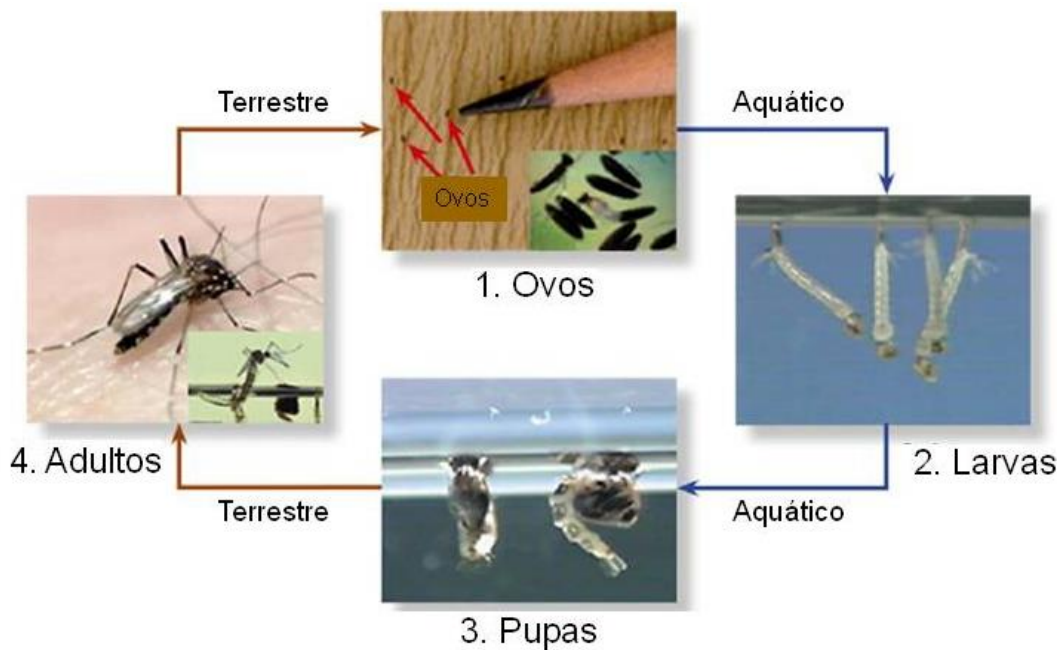


Figura 5 - Ciclo de vida holometábolo do mosquito *Aedes aegypti*.

Fêmeas do mosquito depositam seus ovos (1) próximos a corpos d'água. As larvas (2) eclodem dos ovos e passam por 4 estágios se alimentando de matéria orgânica suspensa no meio aquático. Após alguns dias as larvas dão origem às pupas (3), fase esta em que acontece a metamorfose do mosquito. Os adultos alados (4) emergem das pupas.

FONTES: Center for Disease Control and Prevention (2010).

Mais complexo das interações que o *Aedes aegypti* estabelece com o ser humano é o fato de esse mosquito ser o principal vetor do vírus da febre amarela e dos 4 sorotipos do vírus da dengue, causando assim problemas indiretos ao homem (GUBLER, 2002).

Aliado ao seu destacado papel epidemiológico, o *Aedes aegypti* também representa um sistema modelo proeminente para o estudo de expressão gênica, devido à base excepcional de conhecimento sobre sua fisiologia, bioquímica e desenvolvimento. Nas últimas décadas, este culicídeo vem sendo bastante estudado por muitos grupos de pesquisa, por ser facilmente colonizável em laboratório (GUBLER, 2002).

Um importante trabalho foi publicado no ano de 2007 relacionado ao término do sequenciamento do genoma do mosquito *Aedes aegypti* (NENE et al., 2007). A importância da conclusão desse projeto foi estampada nas páginas do jornal acadêmico Science, sendo capa de edição. Um grupo de cooperação internacional, que inclui cinco cientistas brasileiros, fez o sequenciamento do genoma do mosquito *Aedes aegypti*. O mapeamento dos genes do mosquito permite compreender os

mecanismos moleculares de funcionamento do inseto, encontrando formas mais eficazes de controlar a disseminação das doenças do qual ele é vetor (ARENSBURGER et al., 2010). As informações obtidas através do sequenciamento do genoma de várias espécies ficam armazenadas em bancos de dados gênicos para eventual consulta da comunidade científica.

Os bancos de dados de genoma representam hoje uma das principais ferramentas de suporte para os biólogos moleculares e geneticistas. É de fundamental importância para a pesquisa nesta área realizar cadastros de sequências e de algumas anotações relacionadas, e realizar consultas nestes bancos a fim de levantar dados para análises biológicas. Entre estas análises é possível destacar a comparação de sequências e o descobrimento de novos genes, funções e características de uma nova sequência (HOLT et al., 2011). Atualmente, diversos centros de pesquisa têm feito esforços para cadastrar sequências de diferentes organismos.

Assim, com a grande disponibilidade dessas informações relacionadas ao genoma, não só do *Aedes aegypti*, como de vários outros vetores de doenças debilitantes, cria-se para este século uma grande perspectiva em relação a uma maior evolução no estudo da biologia básica desses insetos vetores (BESANSKY; COLLINS, 1992; WATERHOUSE et al., 2008).

1.3 Actina

Em *Aedes aegypti* são conhecidos nove genes de actina, esses genes estão anotados em bancos de dados usados sempre para uma eventual consulta de qualquer pesquisador.

Actina é a proteína mais abundante encontrada no interior das células eucarióticas (LODSIH et al., 2000). São filamentos flexíveis e dinâmicos, também chamados de microfilamentos. Essas proteínas formam os filamentos finos mais abundantes da célula, apresentam-se com 5 a 9nm de diâmetro e frequentemente se agregam para formar feixes mais grossos (MAGALHÃES et al., 2002).

Em metazoários podemos encontrar duas formas básicas de actina, chamadas de actina G e actina F. Actina G são monômeros que se polimerizam de forma helicoidal e formam então actina F que se trata de uma estrutura quaternária fibrosa com a aparência de um filamento duplo. (MAILLET et al., 2003).

As actinas são encontradas muito abundantemente nos músculos, e em menor quantidade no citoplasma celular de todas as células, constituindo ali de 5 a 30% das proteínas totais presentes no citoplasma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2002). Embora esses filamentos de actina estejam distribuídos por toda a célula, eles se encontram em maior concentração na região abaixo da membrana plasmática chamada córtex (MAGALHÃES et al., 2002).

Os filamentos de actina exercem diversas funções, atuam na mobilidade celular, citocinese, microvilosidades e contração das células musculares. Na citocinese os filamentos de actina interagem com os filamentos de miosina para criar um estrangulamento da célula, necessário para sua divisão, é formado assim um sulco de clivagem separando as células filhas. Os filamentos de actinas presentes no citoesqueleto celular também exercem fundamental importância quanto à mobilidade das células, seja na formação de projeções da membrana celular (microvilosidades), ou simplesmente na capacidade de locomoção das células (motilidade). O movimento celular em direção a um gradiente de atraentes químicos é comum a várias células eucarióticas móveis e implica em polarização celular, extensão da bainha frontal, fixação ao substrato e retração do corpo celular. Todos estes eventos dependem da dinâmica da actina que se organiza em resposta ao sinal recebido. Na contração muscular a actina também não deixa de exercer um importante papel. A interação entre os filamentos de actina e miosina nas células musculares é o grande evento desencadeador da contração muscular, a alta afinidade eletrônica entre os dois filamentos estabelece ligações estáveis. Ambos os filamentos se organizam de tal forma que os finos podem se deslizar sobre os grossos tendo com resultado final a contração muscular (FYRBEG et al., 1998).

Existe um alto grau de conservação entre actinas através da evolução. Por exemplo, há entre 93 e 97 % de similaridade entre as várias actinas dos seres humanos para a mosca da fruta, *Drosophila* (MOUNIER; SPARROW, 1993). No entanto, os genes expressos em diferentes fases e tecidos específicos estão estreitamente relacionados com as formas de actinas, isso sugere uma importância funcional para cada actina (FYRBEG et al., 1998; MOUNIER; SPARROW, 1993).

Os filamentos de actina são classificados basicamente em dois tipos, as actinas musculares e as actinas do citoesqueleto. Esta distinção foi identificada pela primeira vez em mamíferos, com base em duas sequências primárias da proteína e da localização do tecido (VANDEKERCKHOVE; WEBER, 1978). Ambas actinas,

músculares e do citoesqueleto têm sido identificadas em uma variedade de vertebrados, invertebrados e plantas. Segundo Salazar (1994), nos artrópodes as actinas podem ser divididas em três grupos funcionais: actinas do citoesqueleto, actinas musculares de adultos e actinas musculares de larvas (SALAZAR et al., 1994).

A diversidade da estrutura e expressão do gene de actina tem sido bastante estudada em *D. melanogaster* (revisto em BERNSTEIN et al., 1993; MOUNIER; SPARROW, 1993). O genoma da *D. melanogaster* contém seis genes de actina (FYRBERG et al., 1980; TOBIN et al., 1980). Dois genes, ACT5C e ACT42A codificam proteínas que atuam na estrutura do citoesqueleto, com base na expressão onipresente durante a embriogênese (BURN et al., 1989; TOBIN et al., 1994). Os outros quatro genes: ACT57B, ACT87E, ACT79B e ACT88F são predominantemente isoformas musculares específicas, mas cada um é único com um padrão de expressão espacial e temporal (BALL et al., 1987; FYRBERG et al., 1983; COURCHESNE-SMITH; TOBIN, 1989; HIROM; HOTTA, 1985; KELLER et al., 1997; TOBIN; Cook; Burn, 1990).

Vários genes de actina em mosquitos têm sido caracterizados (SALAZAR et al., 1994). Foram identificados cinco genes de actina em *Anopheles gambiae*, um dos quais, Act1D, é constitutivamente expresso. Análise do perfil específico do RNA mensageiro do gene Act1D mostrou que esse RNA está presente em todas as fases de desenvolvimento do mosquito (SALAZAR et al., 1994). Esses autores também caracterizaram essa proteína como uma actina do citoesqueleto. Act1D tem uma identidade grande com o gene actina ACT5C de *D. melanogaster*, que sugere que Act1D é similar ao gene ACT5C de *D. melanogaster*. Estes dois genes compartilham um sistema comum de organização e desenvolvimento de mesmo padrão de expressão e locais similares nos cromossomos (SALAZAR et al., 1994).

Em *Aedes aegypti* só foram relatados estudos de 4 genes de actina até o momento. AeAct-1, se trata de uma actina muscular descrita por Ibrahim et al. (1996), se expressa de forma constitutiva, ou seja, em todas as fases do ciclo de vida do inseto. A sequência nucleotídica codificante de todo esse gene mostrou entre 81% e 89% de identidade com sequências codificantes do gene ACT87E de *D. melanogaster* e genes de actina de *B. mori* (IBRAHIM et al., 1996).

Em 2004 Vyazunova e Lan descreveram outros dois genes de actina em *Aedes aegypti*. Eles mostraram que AeAct-2 também se trata de um gene

constitutivo se expressando em larvas, pupas e adultos e identificada também como uma actina muscular. É interessante ressaltar que o gene AeAct-2 se mostrou nesses estudos com picos de expressão em larvas. Outro gene caracterizado por Vyazunova e Lan (2004) foi o AeAct-3, esse gene não se mostrou como um gene constitutivo, não foi detectado sua expressão em larvas até quarto instar e verificou-se uma alta expressão em pupas machos. Assim o gene AeAct-3 foi o primeiro gene de actina específico de macho em *Aedes aegypti* a ser descrito. A expressão do gene AeAct-3 também se mostrou principalmente no tórax do mosquito e caracterizado como uma actina muscular (VYAZUNOVA; LAN, 2004).

No ano de 2004 Muñoz e colaboradores caracterizaram o gene AeAct-4. Essa actina foi caracterizada como uma actina muscular não constitutiva e altamente expressa no musculo de voo das fêmeas do mosquito *Aedes aegypti*, com alta expressão em pupas fêmeas (MUÑOZ et al.,2004). Trabalhos mais recentes foram realizados usando o promotor desse gene para construir genes quiméricos a fim de serem usados na transgenia de mosquitos visando à supressão de população desses insetos (FU et al., 2009).

Assim, dos nove genes anotados em banco de dados como actinas de *Aedes aegypti*, cinco genes ainda não foram estudados. Sendo assim, a proposta inicial neste presente estudo foi realizar a caracterização temporal quantitativa da expressão dos nove genes anotados como actina em bancos de dados genômicos, tal caracterização poderá proporcionar maior conhecimento da biologia molecular básica do mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti*, o que é importante para o desenvolvimento de estratégias para o combate do mosquito.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Caracterizar o perfil de expressão de nove genes anotados no VectorBase, como actina durante o ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.

2.2 Específico

- Confirmar o perfil de expressão dos quatro genes de actinas já estudados em *Aedes aegypti*.
- Definir o perfil de expressão de cinco novos genes de actina de *Aedes aegypti*;
- Analisar de forma comparativa os níveis de expressões dos nove transcritos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Colônia e manutenção de *Aedes aegypti* em insetário

Ovos, lavas, pupas e adultos do mosquito *Aedes aegypti* (cepa Higgs White-eyes) foram mantidos em insetário de segurança alojado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II pertencente à Universidade de São Paulo.

O insetário onde os mosquitos estavam alojados foi mantido a uma temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a uma umidade relativa do ar de 80 % com fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro). Para eclosão das larvas, os ovos aderidos ao papel filtro foram mergulhados em água autoclavada dentro de frascos de vidro. Larvas e pupas foram criados em recipientes plásticos contendo água destilada onde foram alimentados diariamente com ração de peixe triturada (Sera vipan® (Sera, Aldrich, Steinhein, Alemanha)).

A separação das pupas foi feita através de um separador manual vertical ajustável que separava os indivíduos em três estágios: larvas, pupas machos e pupas fêmeas, de acordo com o tamanho de cada estágio (CARVALHO et al., 2014). Após a separação das formas imaturas, as pupas foram colocadas em copos plásticos vedados com tecido filó e contendo 500 ml de água para a emergência dos adultos (~100 pupas/copo). A água foi retirada dos copos depois da emergência de todos os adultos, os mosquitos então foram mantidos nesses copos plásticos (grupo experimental) ou deslocados para a gaiola (colônia) em proporção sexual aproximada de 3 fêmeas:1 macho para garantir a prosseguimento da colônia. Os adultos foram mantidos ad libitum com solução de sacarose 10 %.

Visando a produção dos ovos e manutenção do ciclo de vida, as fêmeas adultas previamente copuladas obtiveram repasto sanguíneo em camundongos Balb/c anestesiados com injeção de xilazina 10 ng/Kg e acepromazina 1 ng/Kg. Após repasto sanguíneo, as fêmeas foram mantidas com solução de sacarose 10 % *ad libitum*. Os ovos foram então coletados em tubos cilíndricos revestidos de papel filtro.

3.2 Análises *in silico*

Sequências nucleotídicas dos genes de actina de *Aedes aegypti* foram buscadas no banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Foram encontrados 9 genes de actina para *Aedes aegypti* nesse banco de dados e as sequências nucleotídicas de cada gene foi salva. Essas sequências foram comparadas contra outro banco de dados específico de artrópodes vetores de doenças (Vectorbase- www.vectorbase.org) através do algoritmo Blastn para confirmação da similaridade entre as sequências. Essas análises foram efetuadas em 2010. Em fevereiro de 2013, na última atualização do VectorBase, o número de genes anotados como actina subiu para 18. Nesse projeto iremos analisar somente os 9 genes iniciais.

3.3 Síntese de oligonucleotídeos iniciadores

3.3.1 Controles endógenos (*genes normalizadores*)

Dois genes constitutivos de *Aedes aegypti* - RP49 (proteína ribossômica) e H2B (histona) já validados como genes de referência (SALVEMINI et al., 2011) foram utilizados como controles endógenos nos experimentos de PCR e (reação em cadeia da polimerase) e RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida de uma reação em cadeia da polimerase). Quando utilizados os pares de iniciadores desenhados, espera-se uma amplificação de fragmentos de 249 pares de base para o gene RP49 e 148 pares de base para o gene H2B, quando utilizamos moldes de cDNA nas reações. Já quando o molde é DNA genômico, ocorre uma amplificação de um fragmento de 900 pares de base para o gene RP49.

Para os experimentos de RT-PCR em tempo real foi usado outro gene constitutivo de *Aedes aegypti* - S7 (proteína ribossômica), já validado anteriormente como gene de referência (GEISER et al., 2005). O fragmento esperado quando utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores desenhados para esse gene é de 148 pares de base. Estes controles forneceram parâmetros importantes, podendo ser usado como controle positivo (C+) nos experimentos.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nos experimentos de RT-PCR e qRT-PCR para amplificação dos genes RP49, H2B e S7, servindo como controles positivos.

Gene constitutivo	Código no Genbank (número de acesso)	Sequência dos iniciadores- Orientação 5'-3'	Tamanho do fragmento gerado(pb)
RP49	XM_001656684.1	F:CCAAGATCGTCAAGAAGCGG R:GGTTGGTCACAGCGATGG	249
H2B	XM_001657232.1	F:GAACATTGTCAAGGGCGATAA R:GTCGTTGACGAAGCTGTTCA	148
S7	XM_001660119.1	F:CCCGGAGCCCTACCTATAAA R: AACGATGCAGCACAAAGATG	148

F: Iniciador senso (forward), R: Iniciador reverso (reverse)

3.3.2 Construção de pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para 9 genes de actina em *Aedes aegypti*

Os iniciadores para os experimentos de RT-PCR foram desenhados na região codificante de cada cDNA dos 9 genes de actina. Esses iniciadores foram sintetizados de forma a dar especificidade a cada gene. As sequências de cada cDNA dos genes de actina foram alinhadas e foi procurado regiões onde houvesse menor similaridade para o desenho dos oligonucleotídios iniciadores. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores senso e reverso sendo um par de oligonucleotídeos iniciadores para cada cDNA candidato.

Para os experimentos de RT-PCR em tempo real foram desenhados outros 9 pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene de actina. Esses iniciadores foram construídos na região 3'UTR dos genes candidatos, uma vez que foi observado que havia uma grande diferença nas sequências nucleotídicas para essa região entre todos os cDNAs dos genes de actina. Esses iniciadores foram construídos utilizando o programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) e amplificavam fragmentos de aproximadamente 150 pares de base. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores senso e reverso sendo um par de iniciadores para cada cDNA candidato. Os alinhamentos de sequências nucleotídicas foram feitos usando o programa BioEdit (versão 7.0.9.0) (HALL, 1999) ou programa SeqMan II (DNASar-Lasergene).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores sintetizados especificamente para cada gene de actina em *Aedes aegypti* para os experimentos de RT-PCR.

Código GenBank (N° de acesso)	Código VectorBase (N° de acesso)	Sequência dos iniciadores Orientação 5'- 3'	Tamanho do fragmento (pb)
XM_001649481.1	AAEL004616-RA	F: TTCAGGCCGTGCTGAGCT R: ACGCGAACTGTCCACGCTC	553
XM_001659913.1	AAEL001673-RA	F: CTTGGCTGGTCGTGATCTGACT R: CCTGTACGCCAACACTGTCA	358
XM_001651695.1	AAEL005961-RA	F: CCCAATTGAGCACGGTATT R: CATGTGGATCTCCAAGCAGG	874
XM_001651694.1	AAEL005964-RA	F: TTCCCTCTACGCATCTGGC R: ATTTCAACCATCTTTCTTGGGCA	385
XM_001660023.1	AAEL009451-RA	F: CGCACCGGAGGAGCATCCGA R: ACGATGTGGATCTCGAAGCAC	792
XM_001649480.1	AAEL004631-RA	F: ATCTGGCTGGCCGCGATCTT R: CGGTACCACCATGTACCCG	385
XM_001654262.1	AAEL001951-RA	F: ACCCTGAAATATCCATA R: ACGTCTTCATCCGAGAAGTCT	521
XM_001654263.1	AAEL001928-RA	F: TGATGCCCCACGTGCTGTT R: AGCCTTGCGCCATCTTCT	900
XM_001655126.1	AAEL011197-RA	F: AAAACTGTGCTACGTTGCA R: GAAGATCAAATCATTGCC	352

F: Iniciador senso (forward), R: Iniciador reverso (reverse).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores desenhados na região não codificante (3'UTR) especificamente para cada gene de actina em *Aedes aegypti* para os experimentos de qRT-PCR.

Código GenBank (N° de acesso)	Código VectorBase (N° de acesso)	Sequência dos iniciadores Orientação 5´-3´	Tamanho do fragmento (Pb)
XM_001649481.1	AAEL004616-RA	F: GTCGACCTTCCAGCAGATGT R: CCGAACAAATTTATCAGAGTTGTGTA	122
XM_001659913.1	AAEL001673-RA	F: CGAACTCCTCCAGCCACTAC R: TGTCGGTGTTGTTGTCGTTT	143
XM_001651695.1	AAEL005961-RA	F: CACTTCCTCCGAAACCAATG R: TCGATGTTTGCTGGTGTGT	140
XM_001651694.1	AAEL005964-RA	F: CATTGACATGGTACTAACTTTGTG R: AGAGCATCAAACGTATGCAG	138
XM_001660023.1	AAEL009451-RA	F: CTGCCACCACACCCAATTAT R: AGTAGAAGTAGTAGCAAAAATGGA	149
XM_001649480.1	AAEL004631-RA	F: TCGAACGTATCGAATCTTCTCA R: AAAGAGGCTTGCGCAACTAA	149
XM_001654262.1	AAEL001951-RA	F: GCATCGAACATCAAATCACG R: ATGGTTTCTTCCCTGGCTTT	145
XM_001654263.1	AAEL001928-RA	F: CAAACACAGTTGTTACGAAA R: TGGACGCTGACAAGTATCACA	149
XM_001655126.1	AAEL011197-RA	F: CAACAATGAAAAATCAACAGCAA R: TTGCTGGAATTGGTTGAAGA	141

F: Iniciador senso (forward), *R*: Iniciador reverso (reverse)

3.4 Extração de Ácidos nucleicos

3.4.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico de fêmeas de *Aedes aegypti* foi extraído individualmente. A extração foi realizada através do método de fenol-clorofórmio descrito em Sambrook et al. (1989), com algumas modificações.

Basicamente, cada mosquito foi macerado suavemente com pistilo de plástico em microtubo com 300 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM, pH 8, contendo EDTA 100 mM, pH 8, SDS 0,5 % (p/v)), seguido de adição de mais 300 µL do mesmo tampão. Ao microtubo mantido em gelo foram adicionados 1,5 µL de RNase A 20 µg/ml (Sigma, Aldrich, Steinhein, Alemanha) e após suave homogeneização por

inversão, a mistura foi incubada a 37 °C por 45 minutos. Em seguida 3,0 µL de proteinase K 20 mg/mL (Sigma) foram adicionados, a mistura foi agitada suavemente e o microtubo foi incubado a 50 °C por 3 horas. Terminada a incubação, a mistura foi rapidamente resfriada em gelo, 600 µL de fenol equilibrado (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi adicionado e a mistura foi agitada com suave inversão em temperatura ambiente por 5 minutos até completa homogeneização. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 9.000 x g em temperatura de 4 °C por 5 minutos. A porção aquosa (500 µL) do líquido bifásico obtido foi coletado e transferido para um novo microtubo no qual se adicionou 500 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v). Uma nova homogeneização foi realizada em temperatura ambiente por 5 minutos e a mistura foi novamente centrifugada a 9.000g em temperatura de 4 °C por 5 minutos. Foi feita a coleta de 400 µL da fase aquosa, transferida para um novo microtubo. Após adição de 400 µL de clorofórmio, a amostra foi homogeneizada e centrifugada como descrito na etapa anterior. Em seguida, 300 µL da fase aquosa foram coletados e transferidos para um novo microtubo. O DNA genômico foi precipitado por adição de 30 µL acetato de sódio 3 M, seguido de adição de 600 µL de etanol 100 % gelado. A mistura foi homogeneizada suavemente por inversão e incubado a -20 °C por 16 horas. A mistura foi então centrifugada a 9.000g a 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 70 % (v/v) gelado e centrifugado como descrito no passo anterior. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi seco em temperatura ambiente por 10 minutos. Depois de seco, o DNA foi dissolvido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM, pH 8,0), utilizado imediatamente ou armazenado em freezer -20 °C.

3.4.2 Extração de RNA total

Foi utilizado o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen, CA,USA) para o isolamento do RNA total, de acordo com manual do fabricante. O material isolado foi utilizado em análises temporais de acúmulo de transcritos. Para tanto, amostras foram coletadas em diversos períodos de desenvolvimento de *Aedes aegypti*.

Para as análises, números variados de insetos de acordo com cada estágio foram coletados inteiros e definidos como um ponto amostral. Os seguintes estágios

foram coletados: 100 larvas de 1º estadio (1 á 2 dias após a eclosão), 100 larvas de 2º estadio (3 dias após a eclosão), 30 larvas de 3º estadio (4 dias após a eclosão), 10 larvas de 4º estadio (5 dias ou mais após a eclosão), 10 pupas brancas (0-4 h após pupação), 10 pupas escuras (24 h após pupação) machos e fêmeas, 10 adultos machos e fêmeas alimentados com sacarose 10 % e fêmeas alimentadas com sangue 24, 48, 72, e 96 horas após o repasto sanguíneo.

Os insetos em cada ponto amostral após coletados foram mergulhados em microtubos contendo 500 µL de TRIZOL. Os microtubos foram mantidos em gelo seco antes do processamento do material. Após extração, as amostras foram dissolvidas em água previamente tratada com DEPC (0,1 %,v/v) em volume final de 10 a 20 µL, e foram estocadas a -80 °C.

3.5 Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose

3.5.1 Eletroforese de DNA

Todas as amostras foram misturadas a 1/5 do volume de tampão Orange G contendo sacarose 65 % (p/v) Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 10 mM e Orange G (Sigma) 0,3 % (p/v). A eletroforese era realizada em gel composto de agarose (Invitrogen) 1,2 %, 1,0 % ou 0,8 % (p/v) conforme resolução requerida, dissolvida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 50 mM). A mistura foi aquecida em forno micro-ondas para solubilização completa da agarose e posteriormente foi adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/ml). O gel foi transferido para cuba de eletroforese horizontal Owl EasyCast™ E2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e após solidificação, a cuba foi preenchida com tampão TBE 1X, até o gel ser coberto. O marcador molecular utilizado nas eletroforeses foi o 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). A eletroforese foi realizada através da aplicação de uma diferença de potencial constante (80 V a 150 V) por um período de tempo suficiente para o fracionamento, ambos definidos de acordo com o experimento executado.

Após o fracionamento das moléculas, a visualização dos fragmentos era realizada com auxílio de aparelho transiluminador ultravioleta UV Transiluminator (UVP, Upland, CA, USA) e o gel era foto documentado em câmera fotográfica digital Olympus SP-350 (Olympus, Tóquio, Japão).

3.5.2 Eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante

A integridade do RNA total extraído foi avaliada pelo fracionamento das moléculas através de eletroforese em gel de agarose desnaturante. Todas as soluções foram preparadas com água DEPC e a eletroforese de RNA total foi realizada em gel agarose 1,4 % (p/v) em tampão MOPS 1X (MOPS 40 mM pH 7,0, contendo acetato de sódio 10 mM, EDTA 0,1 mM e formaldeído 18 % (v/v)). As amostras de RNA (5 µg), adicionadas ao tampão MOPS 1X, contendo formaldeído 6% (v/v) e formamida 50 % (v/v), foram aquecidas a 65°C por 5 minutos e colocadas no gelo. Posteriormente foi adicionado 1/10 do volume de tampão de corrida (glicerol 50 % (v/v), EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,25 % (p/v) e 0,1 µg de brometo de etídeo) e as amostras foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão MOPS 1X contendo formaldeído 8 % em voltagem constante de 100 V. Após fracionamento das moléculas, as bandas de RNA eram visualizadas sob luz ultravioleta e o gel era foto documentado.

3.6 Amplificação de DNA

As amplificações de DNA genômicos foram feitos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador Biometra[®] (Biometra, Rudolf-Wissel, Goettingen, Alemanha). As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCL 50 mM, Mg⁺⁺ 2,0 mM, dNTPs 0,2mM, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1µL (10 ng) de DNA molde e água ultrapura q.s.p..

No termociclador foi configurado um programa básico para um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 1 minuto, e um passo final de alongação a 72 °C por 10 minutos.

Todos os experimentos efetuados foram providos de controle negativo (C-), consistindo de uma reação de PCR com o mesmo par de iniciador da reação experimental, porém sem um DNA molde (substituído por água ultrapura q.s.p.). A ausência de bandas nos resultados da eletroforese do produto das reações C-validava a confiabilidade das outras amostras amplificadas. Além disso, em

experimentos com moldes de DNA genômico, um controle positivo (C+) também foi realizado. Para isso, os oligonucleotídeos iniciadores H2B e RP49 (Tabela 1) foram utilizados.

3.7 Amplificação e análise temporal de perfil de transcrição por RT-PCR

A presença de transcritos selecionados *in silico* foi determinada usando-se a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), assim como a caracterização dos padrões temporais de transcrição dos genes candidatos. As amostras de RNA total de *Aedes aegypti*, extraídas em diversos estágios de desenvolvimento do mosquito, em larvas, pupas e adultos (como descrito por Material e Métodos no item 3.4.2) serviram como molde para as reações de síntese da 1ª fita de cDNA e posterior amplificação.

3.7.1 Quantificação de RNA total

A quantificação do RNA total extraído foi realizada em NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA), considerando-se que uma unidade de absorvância correspondia a 40 µg/ml medido em comprimento de onda de 260_{nm}. A pureza do RNA extraído foi avaliada pela relação dos valores de absorvância nos comprimentos de onda de 260_{nm} e 280_{nm} (relação 260/280).

3.7.2 Tratamento de RNA total com DNase

O RNA total de cada amostra foi tratado com DNaseI Amp Grade® (Invitrogen), de acordo com protocolo do fabricante. De forma breve, alíquotas de 2,2 µg de RNA de cada amostra foram tratadas com 2,2 U de DNaseI. As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e imediatamente paradas em gelo. Foi adicionado EDTA (concentração final de 2,5 mM) e cada amostra foi incubada a 65 °C por 10 minutos para completa inativação da enzima.

Antes da síntese de cDNA, a eficiência do tratamento foi certificada pela PCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene Ribossomal RP49 e utilizando-se 200 ng de cada amostra de RNA tratado como molde para a reação. Os produtos da amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose para

confirmação da descontaminação das amostras de RNA total. O gel foi corado com brometo de etídeo e apenas as amostras de RNA total que não apresentaram bandas amplificadas serviram como molde para síntese da 1ª fita de cDNA.

3.7.3 Síntese da 1ª fita de DNA complementar (cDNA)

A síntese da 1ª fita de cDNA foi realizada com o sistema SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguindo-se protocolo do fabricante. Resumidamente, foi utilizado como molde 2,0 µg de RNA total tratado, 1 µL de dNTPs 10 mM e 250 ng de oligo(dt)12-18® (Invitrogen) ou iniciador reverso específico (concentração final de 0,5 µM) quando necessário. As reações foram incubadas por 5 minutos a 65 °C e posteriormente resfriadas em gelo. Então foram adicionados 4 µL de tampão de síntese de primeira fita 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) e 2 µL de DTT 0,1 M e a reação foi incubada 2 minutos a 42 °C. Finalmente, foram adicionadas 200 unidades da enzima SuperScript™ II RT e as reações foram aquecidas por 50 minutos a 42 °C. A enzima foi inativada por 15 minutos a 70 °C e o produto sintetizado foi mantido à -20 °C até a utilização ou foi diretamente usado nas reações de PCR.

3.7.4 PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando moldes de cDNA

A amplificação dos fragmentos alvos foi feita em reações com volume final de 25 µL contendo 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCL 50 mM, Mg⁺⁺ 2,0 mM, dNTPs 0,2 mM, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2 µL de cDNA como molde.e água ultrapura q.s.p..

Para realização dos ciclos de amplificação foi usado o equipamento termociclador Biometra® (Biometra, Rudolf-Wissel, Goettingen, Alemanha) e o programa de ciclagem foi configurado para um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 1 minuto, e um passo final de alongação a 72 °C por 10 minutos. O mesmo programa foi mantido para amplificação do fragmento de RNA ribossômico - RP49 e S7. Na etapa de amplificação, os experimentos de RT-PCR foram realizados sempre com a inserção de controles negativos (C-), consistindo de uma reação sem molde de cDNA.

3.8 RT-PCR em tempo real

3.8.1 Preparação do DNA de plasmídeos e geração de curvas-padrão

O DNA de plasmídeos (vetor PCR[®] 2.1), com inserto referente aos fragmentos de cDNA de ~150 pb dos transcritos sujeitos à quantificação, foram utilizados para preparação de curvas-padrão. Para isso, 100 ng de cada DNA de plasmídeo foram utilizados em reações de digestão com a enzima de restrição *Xba*I para linearização dos mesmos. Após linearização, o DNA de plasmídeos foi purificado e em seguida quantificado em NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA). A concentração de cada amostra foi utilizada no cálculo do número de cópias de acordo com a seguinte fórmula:

$$\left[\frac{X \text{ g} / \mu\text{L DNA}}{(\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660 \text{ g} / \text{mol})} \right] \times 6,022 \times 10^{23} \text{ cópias} / \text{mol} = Y \text{ cópias} / \mu\text{L}$$

Para cada gene sob estudo dos níveis de transcrição foi gerada uma curva-padrão, através de 5 diluições do DNA de plasmídeo contendo o inserto específico com concentrações entre 1 ng/ μ L até 0,1 fg/ μ L e cada amostra foi medida em triplicata.

3.8.2 Quantificação dos transcritos

Para a análise quantitativa de expressão dos transcritos foi usado o RNA total purificado. Para isso, amostras de RNA de 3 replicatas biológicas para cada ponto amostral foram reversamente transcritas para síntese da primeira fita de cDNA usando oligonucleotídeos iniciadores específicos.

O volume final de cada reação era de 20 μ L, e cada reação continha 1 μ L de cDNA como molde, 0,4 μ M de cada iniciador. O kit ABSOLUTE[™] QPCR SYBR[®] Green Mix (ABgene, Epsom, SRY, UK) foi utilizado conforme orientação do fabricante, para obtenção do número de cópias dos transcritos através da medição da incorporação de marcador fluorescente (SYBR Green) nos produtos de fita dupla gerados.

Para estimar o número de cópias dos transcritos, o DNA de plasmídeos linearizados contendo fragmentos de cDNA de ~150 pb dos transcritos de interesse foi preparado em diluições seriadas, com concentrações variando de 1 ng/μL até 1 fg/μL. O valor do sinal fluorescente de cada amostra experimental foi comparado com a curva-padrão produzida através da amplificação do fragmento correspondente, clonado nos plasmídeos com concentração previamente conhecida.

O equipamento Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) foi usado para realizar as reações, seguindo instruções do manual do fabricante. As condições de amplificação foram: 95 °C por 15 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. Para os experimentos, cada grupo amostral de 12 pontos do ciclo de vida do mosquito foi analisado em triplicata e o ensaio foi repetido três vezes com lotes biológicos independentes.

3.9 Análise estatística dos experimentos

O teste one-way ANOVA foi adotado para análise estatísticas dos experimentos de quantificação dos transcritos ao longo do desenvolvimento do mosquito. Para todas as análises foi aplicado um intervalo de confiança (IC) de 95 % e valores de probabilidade menores a 0,05 ($p < 0,05$) nas comparações indicaram diferença significativa. O teste de TUKEY também foi usado, considerando que havia diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.10 Bactérias utilizadas e protocolos de preparação

3.10.1 Linhagens de *Escherichia coli* (*E. coli*) e genótipos

As linhagens de *E. coli* utilizadas e seus respectivos genótipos foram:

-DH10B: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *endA1**araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galU galK* λ- *rpsL nupG tonA*.

-DH5α (*Subcloning efficiency*TM *DH5α*TM *Competent cells*, Invitrogen): φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(*r_k⁻, m_k⁺*) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ-.

3.10.2 Preparação de bactérias eletrocompetentes

A partir do estoque de bactérias *Escherichia coli* (cepa DH10B) armazenado à -80°C, obteve-se um pré-inóculo o qual foi semeado em 5 mL de meio de cultura LB líquido (triptona 10 g, extrato de levedura 5 g e NaCl 5 g para 1 L) e incubado sob agitação a 37 °C por 16 horas. A cultura total saturada foi inoculada em 500 mL de meio LB líquido e a mistura foi incubada sob agitação a 37 °C até atingir uma DO_{600nm} de 0,6. A cultura foi repousada em gelo por 30 minutos e em seguida foi centrifugada por 5 minutos a 7000g a 4 °C. Após a centrifugação, o meio de cultura líquido foi descartado e as bactérias sedimentadas foram ressuspensas em 500 mL de água resfriada. As células, novamente centrifugadas como descrito anteriormente, foram ressuspensas em 250 mL de água resfriada. O material foi levado ao último passo de centrifugação sob as mesmas condições e finalmente as bactérias foram ressuspensas em 1,5 mL de glicerol 10 % (v/v) diluído em água. Microtubos foram colocados em gelo e as células eletrocompetentes foram aliqüotadas (40 µL/microtubo), congeladas em banho de gelo seco e armazenadas a -80 °C.

3.10.3 Transformação de bactérias eletrocompetentes

Foi adicionado à aliqüota (40 µL) de bactérias eletrocompetentes um volume de 5 µL da reação de ligação e a mistura foi despejada em cubeta de eletroporação de 0,2 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A cubeta foi colocada em eletroporador Cellject Hybaid (Bioscience Technology, Rockaway, NJ, USA) e as bactérias foram eletroporadas em pulso de 2500 V. Após eletroporação, as bactérias foram recuperadas das cubetas adicionando-se 1 mL de meio de cultura LB líquido, e a mistura foi transferida para novo tubo e mantida a 37 °C por 1 hora em agitação suave. Após este período as bactérias foram plaqueadas em meio de cultura LB-ágar contendo IPTG 1 mM, ampicilina 100 µg/ml e X-Gal 30 µg/mL, ou em placas somente com ampicilina.

3.10.4. Preparação de bactérias quimiocompetentes

Para a preparação de bactérias quimiocompetentes foram utilizadas os estoques de bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α. Para isso, um pré-inóculo foi

semeado em 5 mL de meio LB líquido e foi incubado sob agitação a 37 °C por 16 horas. A cultura total saturada foi inoculada em 500 mL de meio LB líquido e a mistura foi incubada sob agitação a 37 °C até atingir uma DO_{600nm} de 0,6. A cultura foi repousada em gelo por 8 minutos e em seguida foi centrifugada por 5 minutos a 7000g a 4 °C, seguido de descarte do sobrenadante. As bactérias sedimentadas foram ressuspensas em solução gelada de $MgCl_2$ 25 mM, seguido de passo de centrifugação como descrito acima. Novamente o sobrenadante foi descartado e as bactérias foram ressuspensas em solução gelada de $CaCl_2$ 25 mM. A mistura foi novamente centrifugada como descrito, a solução foi descartada e as bactérias foram ressuspensas em 5,37 mL de solução gelada de $CaCl_2$ 0,1 M contendo glicerol 10% (v/v). Em microtubos previamente mantidos em gelo, a solução de bactérias competentes foi aliqüotadas (100 µL/microtubo), congeladas em N_2 líquido e armazenadas a -80 °C.

3.10.5 Transformação de bactérias quimiocompetentes

O volume de 5 µL do produto da reação de ligação foram misturados à aliqüota de bactérias quimiocompetentes cepa DH5α. O microtubo com a mistura foi mantido por 30 minutos em gelo e posteriormente foi realizado um tratamento de choque térmico nas bactérias por incubação a 42 °C por 30 segundos. Rapidamente o microtubo foi colocado em gelo por 2 minutos e em seguida 500 µL de meio LB líquido foram adicionados à mistura. As bactérias foram então incubadas a 37 °C por 1 hora, com agitação moderada e então 100 a 200 µL da mistura foram plaqueados em LB/ágar contendo antibiótico (ampicilina 100 µg/mL).

3.11 Extração e purificação de DNA de plasmídeo

Após transformação do DNA de plasmídeo e plaqueamento das bactérias, as colônias de interesse foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de LB líquido contendo antibiótico em concentração adequada e a mistura foi incubada sob agitação a 37°C por 16 horas. Ao término da incubação, 1,5 mL da cultura foi centrifugado por 1 minuto a 12.000 g. O meio LB foi descartado e as bactérias sedimentadas foram lizadas para recuperação e purificação do DNA de plasmídeo

com o uso do kit QIAGEN Plasmid Mini kit (QIAGEN), de acordo com instruções do fabricante.

3.12 Clivagem de DNA de plasmídeo com endonucleases

Enzimas de restrição da New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA) ou Invitrogen, em condições descritas pelos fabricantes foram usadas para a digestão de amostras de DNA de plasmídeo (0,1 µg a 1 µg). Brevemente, em reações com volumes finais de 20 µL a 100 µL, as digestões foram realizadas na temperatura ótima e no tempo de incubação ideal para cada enzima (1 a 16 horas) em tampão adequado fornecido pelo fabricante. Todos os produtos de digestão foram conferidos por eletroforese em gel de agarose. Para precipitação rápida, a amostra teve seu volume mensurado e foram adicionados 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol 100% gelado. A amostra foi agitada suavemente e o material foi centrifugado por 10 minutos a 12.100 xg. O sobrenadante foi descartado e, ao DNA precipitado, foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado. O material foi novamente centrifugado como descrito, seguido de descarte do sobrenadante. A amostra foi seca por 10 minutos a temperatura ambiente e o DNA foi dissolvido em água ultrapura em volume de 25 µL.

3.13 Ligação de fragmentos de DNA (insertos) em vetores

Os produtos de PCR foram ligados no vetor comercial: pCR[®] 2.1 com TOPO TA Cloning[®] kit (Invitrogen), seguindo-se instruções do fabricante.

3.14 Sequenciamento de DNA

Para a reação de sequenciamento foram utilizados como moldes os clones de interesse selecionados. Essa reação foi realizada com kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) conforme manual do fabricante. As reações continham 1 µM de oligonucleotídeo iniciador específico, 0,75 µL de BigDye, 3,25 µL de tampão Save Money (Tris-HCl 200 mM, pH 9,0, contendo MgCl₂ 5 mM), 100 ng de produto de PCR ou 100 a 200 ng de DNA de plasmídeo e água ultrapura q.s.p..

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Biometra® (Biometra) e o programa foi configurado com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 96 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos, e extensão a 60°C por 4 minutos.

O passo posterior à reação de sequenciamento foi a precipitação das amostras. Para isso a cada reação foi adicionado 90 µl de isopropanol 66% (v/v) e as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente num local protegido de incidência de luz. Os produtos da precipitação foram centrifugados a 15.300 xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 150 µl de isopropanol 75% (v/v), seguido de novo passo de centrifugação como descrito acima. O sobrenadante foi novamente descartado e as amostras foram secas em temperatura ambiente por 10 minutos. Previamente dissolvidas em 10 µl de formamida, cada amostra foi sequenciada no aparelho Sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) e as sequências obtidas foram analisadas no programa Seqman (software DNASTar, Lasergene).

4 RESULTADOS

4.1 Análises *in silico*

O código disponibilizado pelo banco de dados Vectorbase foi usado como identificação diferencial para os nove genes de actina em *Aedes aegypti* no restante de todo o trabalho. O tamanho da região codificante de cada gene, bem como o número de exons e introns foi diferencialmente observado (Tabela 4). Cada gene possui um número de bases nucleotídicas específicas, bem como número de exons e introns diferenciados.

Tabela 4 – Tamanho da região codificante e número de exons e introns de nove genes de actina em *Aedes aegypti* anotados no Vectorbase

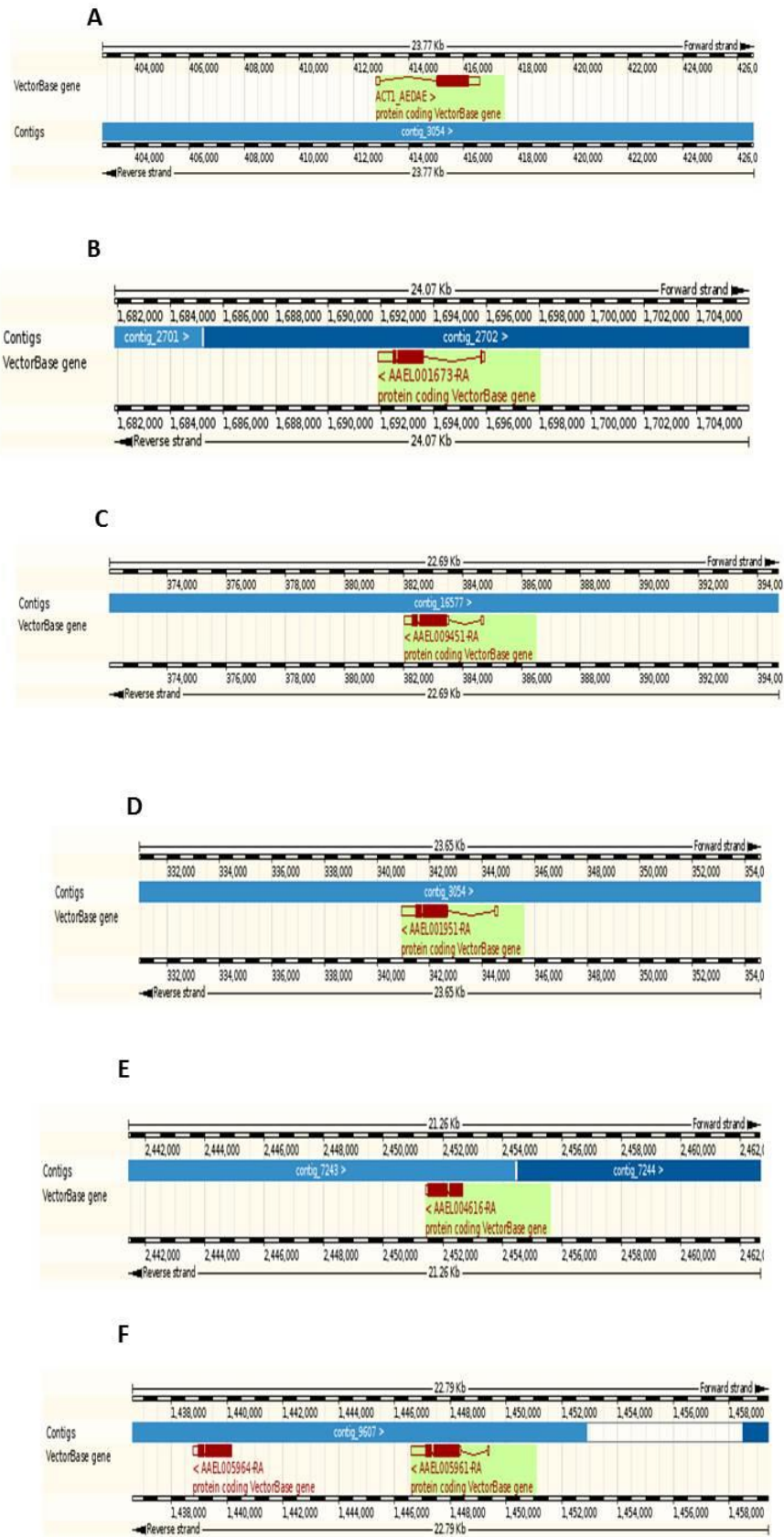
Código dos genes de actina no Vectorbase	Tamanho da região codificante(Pb)	Exons	Introns	Anotação no VectorBase
AAEL001928-RA	1690	2	1	Actina-1
AAEL001673-RA	3350	3	2	Actina-2
AAEL009451-RA	1701	3	2	Actina-3
AAEL001951-RA	2153	3	2	Actina-4
AAEL004616-RA	1200	2	1	Actina
AAEL005961-RA	2307	2	2	Actina
AAEL005964-RA	1946	2	1	Actina
AAEL004631-RA	1528	1	0	Actina
AAEL011197-RA	1559	2	1	Actina
AAEL011197-RB	1612	2	1	Actina

O gene AAEL011197-RA está anotado no Vectorbase como sendo um gene com *splicing* alternativo. É interessante notar também a proximidade dos genes AAEL005961 e AAEL005964 que se encontram no mesmo *contig*.

O gene AAEL001928 está anotado como Actina-1 e apresenta uma região codificante de 1690 pares de bases. O gene possui 2 exons e um 1 intron (Tabela 4), e está no *contig* de número 3054 (Figura 6.A). O gene AAEL001673 está anotado como Actina-2 e apresenta uma região codificante de 3350 pares de bases. Esse gene possui 3 exons e 2 introns (Tabela 4), e está alojado no *contig* de número 2702 (Figura 6.B). O gene AAEL009451 está localizado no *contig* de número 16577 (Figura 6.C). Esse gene está anotado como Actina-3 e possui uma região codificante de 1701 pares de bases. O gene apresenta 3 exons e 2 introns (Tabela 4). O gene AAEL001951 está anotado como Actina-4, se localiza no *contig* de número 3054 (Figura 6.D), possuindo uma região codificante de 2153 pares de bases. Esse gene possuiu 3 exons e 2 introns (Tabela 4).

O gene AAEL004616 possui uma região codificante de 1200 pares de base, está localizado no *contig* de número 7243 (Figura 6.E) e apresenta em sua estrutura 2 exons e 1 intron (Tabela 4). O gene AAEL005961 está localizado no contigue 9607 (Figura 6.F), apresentando uma região codificante de 2307 pares de bases. Esse gene possui 2 exons e 2 introns (Tabela 4). O gene AAEL005964 também está localizado no *contig* 9607 (Figura 6.G), e possui uma região codificante de 1946 pares de bases. O gene possui 2 exons e 1 intron (Tabela 4).

O gene AAEL004631 possui uma região codificante de 1528 pares de bases. Esse gene está localizado no *contig* 7242 (Figura 6.H) e possui 1 exons e nenhum intron (Tabela 4). Para o gene AAEL011197 observamos uma variação de 2 *splicing*. Esse gene possui 2 exons e 1 intron (Tabela 4), e está localizado no *contig* de número 20261(Figura 6.I). A primeira forma de *splicing* para esse gene apresenta uma região codificante de 1559 pares de bases e a segunda forma de *splicing* apresenta uma região codificante de 1612 pares de bases.



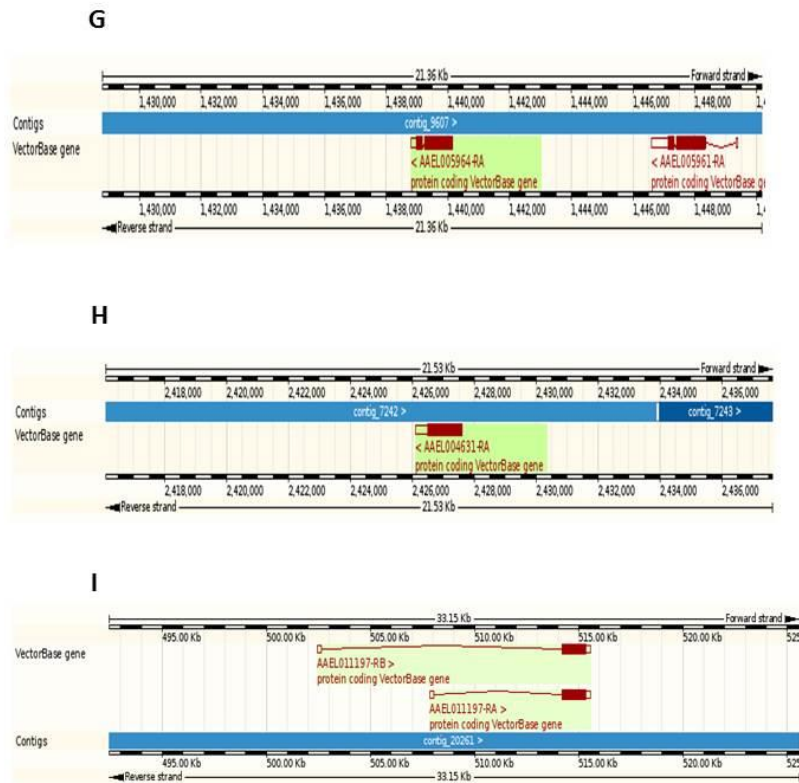


Figura 6 – Localização dos genes de actina de *Aedes aegypti* dispostos em *contigs* - Podemos notar que o gene AAEL011197 apresenta dois *splicing* diferentes e que os genes AAEL005964 e AAEL005961 estão bem próximos, localizados no mesmo *contig*. A: localização do gene AAEL001928, B: localização do gene AAEL001673, C: localização do gene AAEL009451, D: localização do gene AAEL001951, E: localização do gene AAEL004616, F: localização do gene AAEL005961, G: localização do gene AAEL005964, H: localização do gene AAEL004631, I: localização do gene AAEL011197.

Fonte: Vectorbase (2014)

4.2 Construção de pares de oligonucleotídeos iniciadores na região ORF específicos para 9 genes de actina em *Aedes aegypti*

Para a construção dos pares de oligonucleotídeos iniciadores para os experimentos de RT-PCR, as sequências nucleotídicas das regiões codificantes dos genes de actina foram alinhadas para facilitar a visualização e o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (Figura 7). Podemos observar através do alinhamento dessas sequências a grande identidade entre as bases nucleotídicas na região

codificante desses cDNAs de actina, trazendo assim maior dificuldade para a construção de iniciadores específicos para cada actina.

Cada cDNA foi analisado individualmente procurando regiões com sequências nucleotídicas onde houvesse maior diferença em relação a todos os outros cDNAs dos genes de actina e que principalmente na extremidade 3' do iniciador desenhado houvesse sempre a última base nucleotídica distinta de todas as outras sequências dos cDNAs de actina nessa mesma região, procurando assim dar maior especificidade ao iniciador desenhado. A construção dos oligonucleotídeos iniciadores foi feita levando em conta o tamanho dos fragmentos que seriam produzidos (200 a 1000 pares de bases). Esses iniciadores foram desenhados na região codificante (ORF) de cada cDNA candidato e usados nos experimentos de RT-PCR.

Todos os iniciadores desenhados na região ORF dos cDNAs dos genes de actina foram utilizados somente nos experimentos de RT-PCR, uma vez que amplificavam fragmentos muito maiores que 150 pares de base, o que limitava o uso desses iniciadores nos experimentos qRT-PCR.

	10	20	30	40	50
AAEL001673-RA	ATGTGTGACGATGATGTTGCTGCGTTGGTCGTTGATAACGGATCCGGTATG				
AAEL001928-RAT.A...C.....CC.C.T...C.....A...				
AAEL001951-RAC...GA.AC.A...A...C.....C.....C...				
AAEL004616-RAC...C.AA...C.....A.C.C.T.....A...				
AAEL004631-RAC.....TC...T...C.....C.....C.....				
AAEL005961-RAC...GA...C.C.T...C.....C.....A...				
AAEL005964-RAC.....CA.GA.AC.T..TA...C..T..T..A...				
AAEL009451-RAC..CAG.GA.....G..C.T.C.....A...				
AAEL011197-RAA.G.....C..C.C.T..C..C.T.....				
AAEL011197-RBA.G.....C..C.C.T..C..C.T.....				

	50	60	70	80	90	100
AAEL001673-RA	TGTGCAAGGCCGGTTTCGCCGGTGATGACGCCCCACGTGCCGTCTTCCCCTC					
AAEL001928-RAT.....T.....T.....T.....T.....T.....G..					
AAEL001951-RAT.....T.....T.....T.....T.....T.....G..					
AAEL004616-RAA.....G..C..T..T..C..G.....G.....					
AAEL004631-RAC.....C.....T..T..C..C.....G.....					
AAEL005961-RAT.....T.....T.....T.....T.....T.....A..					
AAEL005964-RAA.G.....T.A.A..C.....T.....A.T.T..					
AAEL009451-RAT..C..T.....T..T..G.....A.....G..					
AAEL011197-RAA..C..T.....C.....C.....G..					
AAEL011197-RBA..C..T.....C.....C.....G..					

	100	110	120	130	140	150
AAEL001673-RA	TCGATTGTCGGTTCGCCCCGCCACCAGGGTGTGATGGTCGGTATGGGTCAGA					
AAEL001928-RA	..C.....A.....A.....A.....A.....A.....A.C.					
AAEL001951-RA	..C.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....A.					
AAEL004616-RAG..C..TG...G.....A.....A.....A.....					
AAEL004631-RAC..G..C..T..T..G.....C.....A.....					
AAEL005961-RA	..C.....T.....A.....A.....A.....A.....A.....C.					
AAEL005964-RAC..T..C.....A..A.....A.....A.....A.....C.					
AAEL009451-RAA.....T..G.....A.....A.....A.....A.....A.....					
AAEL011197-RA	..C.....A..T.....T.....T.....T.....T.....A.....					
AAEL011197-RB	..C.....A..T.....T.....T.....T.....T.....A.....					

	150	160	170	180	190	200
AAEL001673-RA	GAAGGACTCGTACGTCGGTGTGAGGCCAGAGCAAGCGTGGTATCCTCACC					
AAEL001928-RA	C.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....TC.....A.....					
AAEL001951-RA	A..A..TG.C.....A.....A.....A.....A.....A.....ATC.....A.....					
AAEL004616-RAC.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....A..C.....G..					
AAEL004631-RAT.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....A.....G..T					
AAEL005961-RA	C.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....					
AAEL005964-RAT..A..T..T.....A..T..ATCA.....A.....A.....A.....T					
AAEL009451-RAG..C.....G.....C.....C.....C.....C.....G.....T..G..G					
AAEL011197-RAC.....C.....C.....C.....C.....C.....A..A.....T..G..					
AAEL011197-RBC.....C.....C.....C.....C.....C.....A..A.....T..G..					

	200	210	220	230	240	250
AAEL001673-RA	CCCTGAAGTACCCGATCGAGCACGGTATCATCACCAACTGGGATGATATGGA					
AAEL001928-RAA..T.....T.....					
AAEL001951-RAA..T..C..A.....					
AAEL004616-RAA..G.GT.....C..C.....					
AAEL004631-RA	.T.....C.....					
AAEL005961-RAA..T.....T.....					
AAEL005964-RA	.TT.....A..T.....A.....G.....					
AAEL009451-RA	.G.....T.....T.....C..C.....					
AAEL011197-RAG.....G.....C.....					
AAEL011197-RBG.....G.....C.....					

	250	260	270	280	290	300
AAEL001673-RA	GAGAAGATCTGGCACCCACCTTCTACAATGAGCTGCGCGTTGCCCCAGAAG					
AAEL001928-RAT.....A..T.....					
AAEL001951-RAT.....T.....C..T.....A..A..T..T.....					
AAEL004616-RAT.....T.....A..A..T..G..G.....					
AAEL004631-RAT.....C..A.....C..G.....					
AAEL005961-RAT.....A..T.....					
AAEL005964-RAT.....T.....A..G..T..T..G.....					
AAEL009451-RAT.....G.....C..T.....T..C..A..G..G.....					
AAEL011197-RAT.....T.....T.....C..G.....					
AAEL011197-RBT.....T.....T.....C..G.....					

	300	310	320	330	340	350
AAEL001673-RA	AGAGCACCCAGTGCTGCTGACTGAAGCCCCCTGAACCCAAAGGCTAACCGT					
AAEL001928-RAT.....G.....A.....C.....C.....					
AAEL001951-RAA..T.....AT.....G..T..T.....T..C..T..C.....					
AAEL004616-RA	G.....T.....C.....T.....C.....T.....C.....C.....A.....					
AAEL004631-RA	G..A.....T..T.....G.....T.....C.....C.....C.....					
AAEL005961-RAT.....G.....A.....C.....C.....C.....					
AAEL005964-RA	G..A..T.....C.....T.....A.....T..A..C.....T..A..A..T..C.....					
AAEL009451-RA	G.....T..GA..T.....G..G..T..G.....G..T.....C.....					
AAEL011197-RA	G..A.....C.....A..G.....G..C.....G.....C.....G.....					
AAEL011197-RB	G..A.....C.....A..G.....G..C.....G.....C.....G.....					

	350	360	370	380	390	400
AAEL001673-RA	GTGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACTCGCCAGCCATGTA					
AAEL001928-RAT.....					
AAEL001951-RA	.C.....T.....A..A..GCT.....TG.....					
AAEL004616-RA	A.....C.....C.....GC..C.....					
AAEL004631-RA	.C.....C.....					
AAEL005961-RAT.....					
AAEL005964-RA	.C.....G..A..A..T.....A..G.....TAGT.....AG.....					
AAEL009451-RA	.C.....T.....T.....GC..G..T..G.....GCT.....					
AAEL011197-RAG.....C..A.....A..A..G.....					
AAEL011197-RBG.....C..A.....A..A..G.....					

	400	410	420	430	440	450
AAEL001673-RA	TACGTCGCCATCCAGGCCGTGCTGTCCCTGTATGCTTCCGGTCGTACCACCG					
AAEL001928-RAT.....A..T..T.....C..C.....T.					
AAEL001951-RA	..T..T.....A..T..T.....C..C.....T..T.					
AAEL004616-RA	..T..G.....T.....AG..T.....C...G..A..C..T..G.					
AAEL004631-RAT.....T.....T.....C.....C.....T.					
AAEL005961-RAT.....T.....T..T.....C..C.....T.					
AAEL005964-RA	..T...A..T...T..A..T...C..C..A..T..C...G.					
AAEL009451-RAG.....T.....T.....C.....C.....T.					
AAEL011197-RAT.....T.....C.....C.....T.					
AAEL011197-RBT.....T.....C.....C.....T.					

	450	460	470	480	490	500
AAEL001673-RA	CGGTATTGTGCTCGACTCCGGTGATGGTGTCTCCACACTGTCCCAATCTAT					
AAEL001928-RA	T.....C..T..G..T.....A.....C.....C.....C					
AAEL001951-RA	T.....T..G..T.....A.....T..C.....C.....C					
AAEL004616-RA	G.....G.....A.....C..G..C.....C.....C					
AAEL004631-RAG.....A.....C..G..C.....C.....C					
AAEL005961-RA	T.....C..T..G..T.....A.....C.....C.....C					
AAEL005964-RA	G.....TTCT..T..T.....A..T.....TTGC..T..C...T.					
AAEL009451-RA	...G.C.A..T.....A.....G.....C.....C.....C					
AAEL011197-RAT.....A..C.....G.....A.....C.....C					
AAEL011197-RBT.....A..C.....G.....A.....C.....C					

	500	510	520	530	540	550
AAEL001673-RA	ATGAAGGTTATGCTCTGCCCATGCCATCCTCCGTCTGGACTTGGCTGGTCG					
AAEL001928-RA	.C.....C.....A.....A.....T.....C.....C.....C					
AAEL001951-RA	.C.....C.....A.....A.....T.....C.....C.....C					
AAEL004616-RA	.C..G.....C..CT..A.....G.....TC.....C.....C					
AAEL004631-RA	.C.....C..T...A.....G.....TC.....C.....C					
AAEL005961-RA	.C.....C.....A.....A.....T.....C.....C.....C					
AAEL005964-RA	T.....A..T..A.....T..C..T..T.....T.....TA.....C					
AAEL009451-RA	.C.....G.....T..G..A.....C.....C.....C.....C					
AAEL011197-RA	.C.....C.....A..C..T..G.....T.....C.....C.....C					
AAEL011197-RB	.C.....C.....A..C..T..G.....T.....C.....C.....C					

	550	560	570	580	590	600
AAEL001673-RA	CGTGATCTGACTGACTACCTGATGAAAATCCTCACCGAGCGTGGCTACTCTT					
AAEL001928-RA	..C.....C.....G.....G.....A.....A.....C.....C					
AAEL001951-RA	..C.....C.....G.....T..G.....A.....A.....C.....C					
AAEL004616-RA	..C.....C..C..T..T.....CC.....G.....A..A..A..A..A					
AAEL004631-RA	..C.....T...C..T.....G.....A.....C.....C.....C					
AAEL005961-RA	..C.....C..T.....G.....G.....G.....G.....C.....C					
AAEL005964-RAT...A..T.....G..AA..G..T..A..A..A.....C					
AAEL009451-RA	.C.....T.....C.....T.....G.....T..G.....C.....C.....C					
AAEL011197-RA	.C.....C..T.....G.....G.....T..A.....T.....C.....C					
AAEL011197-RB	.C.....C..T.....G.....G.....T..A.....T.....C.....C					

```
600 610 620 630 640 650
AAEL001673-RA TTTCACACCACTGCCGAACGTTGAAATCGTCCGCGATATCAAGGAAAAGCTG
AAEL001928-RA C.....T..C..T.....T..T..C..T.....G.....
AAEL001951-RA .....C..T.....T..T..C.....G.....
AAEL004616-RA A.....G..C.....G..G.....T..G..C.....G.....
AAEL004631-RA .....C.....G.....T..C.....G.....
AAEL005961-RA .....T.....T..T..C..T.....G.....
AAEL005964-RA .....T..T..C..T.....T..T..T.....A.....G..A..A
AAEL009451-RA G.....T..G..C.....T..T..T.....G.....
AAEL011197-RA G.....T.....T..T..C.....A.....
AAEL011197-RB G.....T..T..C.....A.....
```

```
650 660 670 680 690 700
AAEL001673-RA TGTGCTACGTCGCTCTGGACTTCGAGCAGGAAATGGCCACCGCTGCTGCCTC
AAEL001928-RA .....T.....
AAEL001951-RA .....CAAG.....C..TA.....
AAEL004616-RA .....CT.....T..A..A..G.....T..T.....
AAEL004631-RA .....C.....T..A.....T.....
AAEL005961-RA .....C.....
AAEL005964-RA A..T.....A..C.....A..A..A..GTC.TTAG.A..T.GT.A..
AAEL009451-RA .....T..A.....CAGG.T.....C..T..
AAEL011197-RA .....T..A.....CT.G..
AAEL011197-RB .....T..A.....T..A.....CT.G..
```

```
700 710 720 730 740 750
AAEL001673-RA TCCACCTCCCFTGAGAAGTCCTATGAACTTCCCACGGTCAGGTCATCACCA
AAEL001928-RA .....G.....T.....T..T.....
AAEL001951-RA A.GT.T..ATCC.....T.....T..C..A.....A..
AAEL004616-RA T..AG.T.G.....A..C.....C.....A.....G.....
AAEL004631-RA .....G.T..G.....C.....A.....G.....
AAEL005961-RA .....T.....T..T.....A.....
AAEL005964-RA ..AT.T..G..G.....A..A.....G.....T.....A..T..A..
AAEL009451-RA ..TT.....TTCG.....T.G.....A.....
AAEL011197-RA .....T.....G.....A..G..C.....T..A..A.....
AAEL011197-RB .....T.....G.....A..G..C.....T..A..A.....
```

```
750 760 770 780 790 800
AAEL001673-RA CATCGGTAACGAACGTTTCCGCTGCCCAGAAGCCCTGTTCCAGCCTTCCTTC
AAEL001928-RA ...T..C.....G.....T..C.....A.....
AAEL001951-RA A.....C.....G.....TGCT.....T.....A.....
AAEL004616-RA .....A.....G..C.....T..G..A.T..C.....G..G..
AAEL004631-RA .....G.....C.....T.....T..C.....G.....
AAEL005961-RA .....C.....G.....C.....A.....
AAEL005964-RA ...T..AGC...G..A.....T.....T..A..T..A..A..T...
AAEL009451-RA ...T..C.....G..C.....GC...G..G..T.....G.....
AAEL011197-RA .....C..T.....T.....G..T..C.....A..G..
AAEL011197-RB .....C..T.....T.....G..T..C.....A..G..
```



```

      800      810      820      830      840      850
AAEL001673-RA TCCTGGGTATGGAATCTTGCGGTATCCACGAAACCGTCTACAAC TCGATCAT
AAEL001928-RA .....A.....T.....T..C.....
AAEL001951-RA .....A.....AACT..C..T..T.....G.....
AAEL004616-RA ..A.C..A.....A.GGTG..AG.T.....T..G.T.....A
AAEL004631-RA .....G.....
AAEL005961-RA .....A.....GCT.....T.....T..C.....
AAEL005964-RA ..T...C.....A.GGCA..CG.A.....T..A...G.G.T...
AAEL009451-RA .....A.....G.CAC...G.T.....G..T.....
AAEL011197-RA .....C.....G.C.....AC.....
AAEL011197-RB .....C.....G.C.....AC.....

```

```

      850      860      870      880      890      900
AAEL001673-RA ATGAAGTGGCAGCTCGATATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACTGTATGT
AAEL001928-RA .....A.....T.....C.....T..T..T.....C.A.
AAEL001951-RA ...CGT...T...C...C...T..C..T..T...GC..T...
AAEL004616-RA ..A.....C.....T.....T.....T..C..C...
AAEL004631-RA .....C.....T.....TC..G...
AAEL005961-RA .....T.....C...C...T..C..T.....C...
AAEL005964-RA ...CGT..T..T..G...T..G...T.....A..T..GC..C...
AAEL009451-RA ...CGT.....C...C...T.....T..T...GC..C.C...
AAEL011197-RA .....C.....A.....T.....T.....A..AT.A.
AAEL011197-RB .....C.....A.....T.....T.....A..AT.A.

```

```

      900      910      920      930      940      950
AAEL001673-RA GTCCGGTGGTACCACCATGTACCCAGGTATTGCTGATCGTATGCAGAAGGAA
AAEL001928-RA A..T.....
AAEL001951-RA ...T.....
AAEL004616-RA .....A..AT.G.....T.G.C..A..C..C..A...ACGC...
AAEL004631-RA ...C.....G.....C.....
AAEL005961-RA ...T.....
AAEL005964-RA .....A..T..G.....T..T.....A..G
AAEL009451-RA C...A.....T.....C...C.....G
AAEL011197-RA A...A.....A..C..C.....
AAEL011197-RB A...A.....A..C..C.....

```

```

      950      960      970      980      990      1000
AAEL001673-RA AAATCACTGCCCTGGCTCCATCCACCATCAAGATCAAGATCATTGCCCCACCA
AAEL001928-RA .....A..T...G...TT.T.....T.....
AAEL001951-RA ...T.....G
AAEL004616-RA ..C.GT.CA.G..C...CA..T.G...G...G.C.....
AAEL004631-RA .....C...C..C..G...G.....C.....
AAEL005961-RA .....C...T..C..G.....T.....
AAEL005964-RA .G..A..C..G..T..A..A.T.....A..G..G
AAEL009451-RA .G.....CT.G...C..G..G.....G..G
AAEL011197-RA .....C..T.G...C..G..G.....G.....A.....
AAEL011197-RB .....C...C..G..G...G.....A.....

```

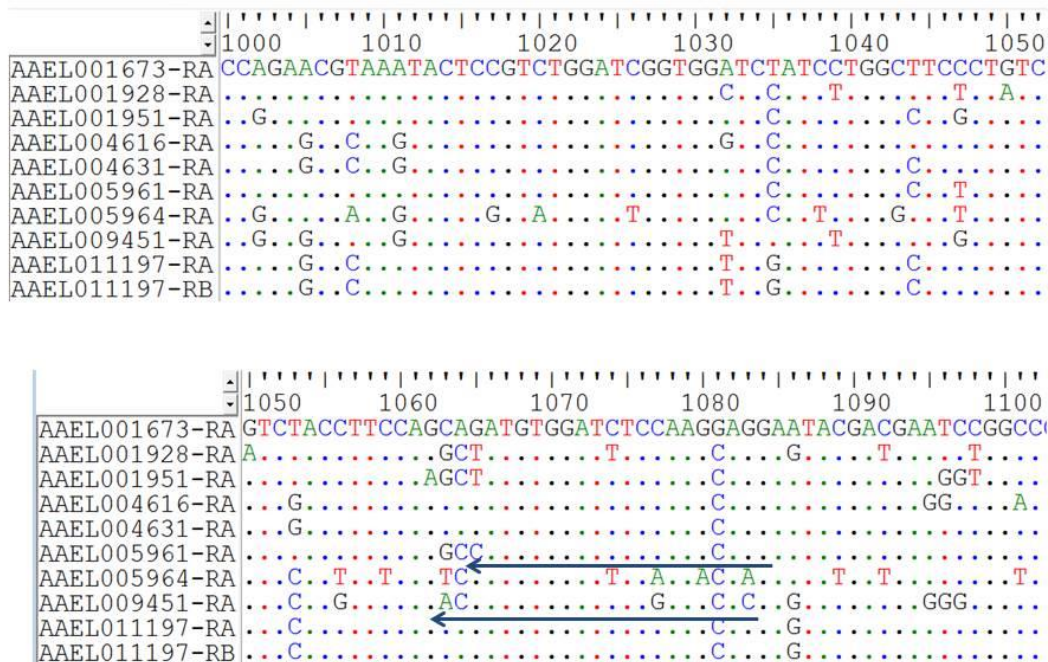


Figura 7 – Alinhamento de fragmentos dos cDNAs dos genes de actina (região ORF) mostrando a grande semelhança entre eles - Na figura está destacado com setas em vermelho as regiões onde foram desenhados os iniciadores senso e com setas azuis onde foram desenhados os iniciadores reversos. Todos esses iniciadores foram usados para amplificação de fragmentos em RT-PCR.

4.3 Amplificações genômicas de fragmentos dos genes candidatos-oligonucleotídeos iniciadores desenhados na região traduzida (ORF)

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados na região traduzida (ORF) dos genes de actina, foram testados usando a reação da cadeia da polimerase (PCR) utilizando DNA genômico de *Aedes aegypti* como molde. Foi usado como controle positivo da reação o gene constitutivo H2B.

Após a amplificação dos fragmentos foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1 % e levado o gel de agarose a luz ultravioleta para observação. A confirmação da funcionalidade dos iniciadores foi feita comparando o tamanho dos fragmentos no gel de agarose com o tamanho dos fragmentos esperados. Como resultado, dos 9 pares de iniciadores específicos testados (Tabela 2), 7 renderam

fragmentos amplificados com especificidade (Figura 8). Os outros 2 pares de iniciadores desenhados, embora tenham amplificado fragmentos de tamanhos esperados, não se mostraram específicos, amplificando também fragmentos de tamanhos inesperados.

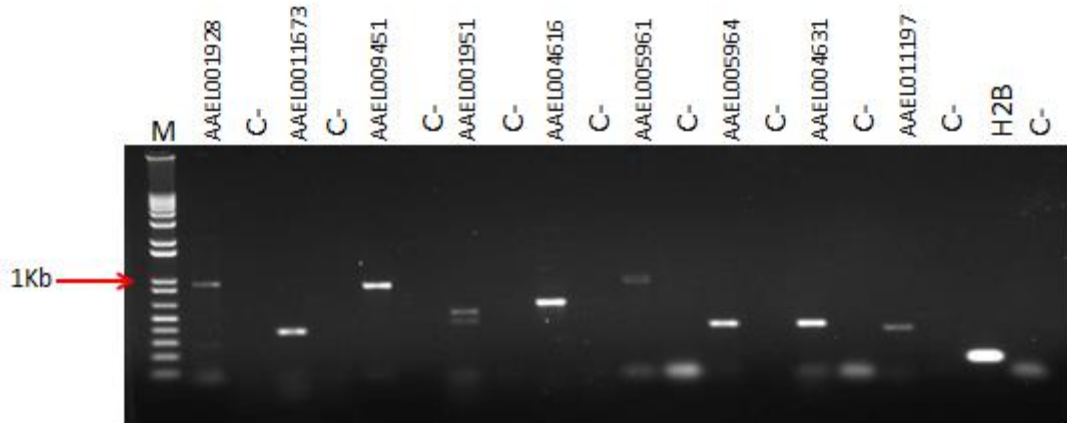


Figura 8 – Gel de agarose 1% mostrando os fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados (região ORF) em DNA genômico - Observamos amplificação específica de fragmentos para os iniciadores dos genes AAEL001673, AAEL009451, AAEL004616, AAEL005961, AAEL005964 e AAEL004631 e AAEL011197.

Todos os fragmentos amplificados foram clonados (Figura 9), sequenciados e confirmados por análises de similaridade (blastn) nos bancos de dados GenBank e VectorBase.

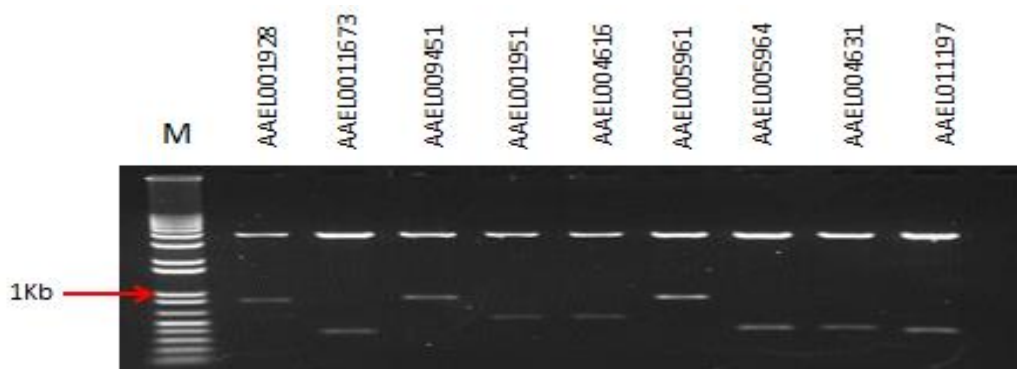


Figura 9 – Gel de agarose 1,2% dos produtos de digestão do DNA de plasmídeos - Os fragmentos na parte superior do gel correspondem ao plasmídeo usado para clonagem. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

4.4 Confirmação do tratamento de RNA total com DNase

Após a extração do RNA total dos insetos nas diversas fases do seu ciclo de vida, o material extraído foi tratado com a enzima DNase para a eliminação de qualquer eventual contaminação de DNA junto ao material extraído. Após o tratamento foi feita uma reação de PCR onde foi usado um par de oligonucleotídeo iniciador para um gene constitutivo previamente conhecido, RP49 (SALVEMINI et al., 2011), em todas as amostras nas diversas fases do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Como controle positivo da reação foi usado o genômico do *Aedes aegypti* onde foi amplificado um fragmento de 900 pares de base correspondente ao iniciador de RP49 usado. Do produto da reação de PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1% e levado à luz ultravioleta para a confirmação do tratamento.

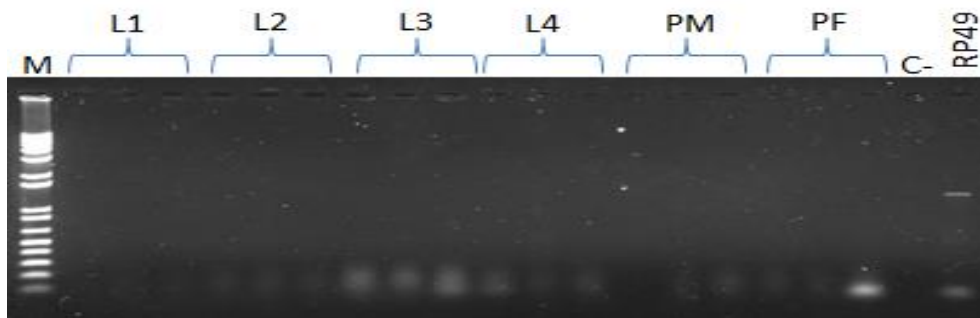


Figura 10 – Gel de agarose 1,2% dos produtos da PCR controle - O gene RP49 já validado como gene constitutivo (Salvemini et al., 2011) foi usado como controle positivo do experimento. L1-L4: larva de primeiro a quarto estágio, PM: pupa macho, PF: pupa fêmea, C-: controle negativo, M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen)

4.5 Confirmação da integridade dos cDNA (DNA complementar) nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*

Foi feita a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA extraído nas diversas fases do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Foi realizado também a confirmação da integridade dessas amostras de DNA complementar (cDNA) a partir de uma reação de PCR usando como iniciador para todo o experimento o par de oligonucleotídeos iniciador para o gene RP49, previamente descrito como gene constitutivo (SALVEMINI et al., 2011). Esse par de

iniciador amplifica em moldes de cDNA um fragmento de 249 pares de base e em moldes de DNA genômico um fragmento de 900 pares de base.

A confirmação da integridade das amostras de DNA complementar (cDNA) foi feita através da visualização de fragmentos com 249 pares de base em todas as amostras correspondentes as diversas fases do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* (Figura 11).

Esse experimento foi usado como controle positivo para todo o restante dos experimentos posteriores de PCR utilizando moldes de cDNA.

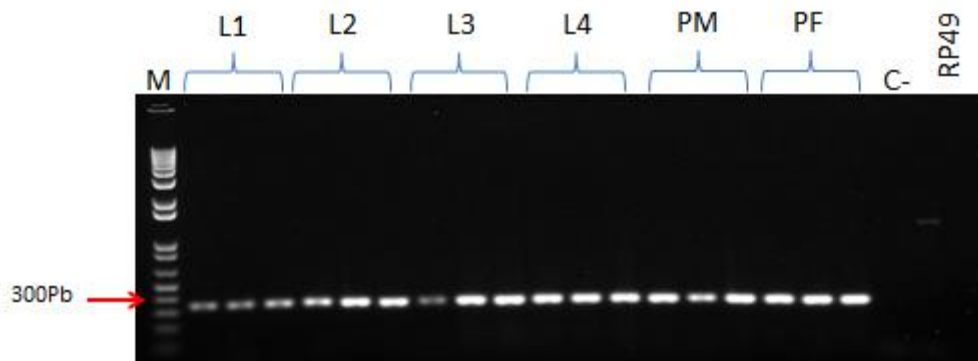


Figura 11 - Gel de agarose 1% mostrando a amplificação de fragmentos para a confirmação da integridade dos cDNAs – fragmentos amplificados com 249 pares de base em todas as amostras de DNA complementar (cDNA) nas diversas fases do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*, confirmando assim a integridade das amostras. L1-L4: larva de primeiro a quarto estágio, PM: pupa macho, PF: pupa fêmea, C-: controle negativo, C+: controle positivo (iniciador para o gene RP49 usando como molde DNA genômico), M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen)

4.6 Caracterização semi-quantitativa temporal dos perfis transcricionais dos genes de actina

As análises de acúmulo de transcritos pela técnica de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR semi-quantitativo) foram realizadas para investigar os perfis transcricionais dos nove genes de actina presentes no genoma do mosquito *Aedes aegypti*. A presença de fragmentos no gel indica que houve expressão do gene candidato na fase correspondente ao ciclo de vida do *Aedes aegypti*. A análise temporal foi realizada em triplicatas biológicas e experimentais.

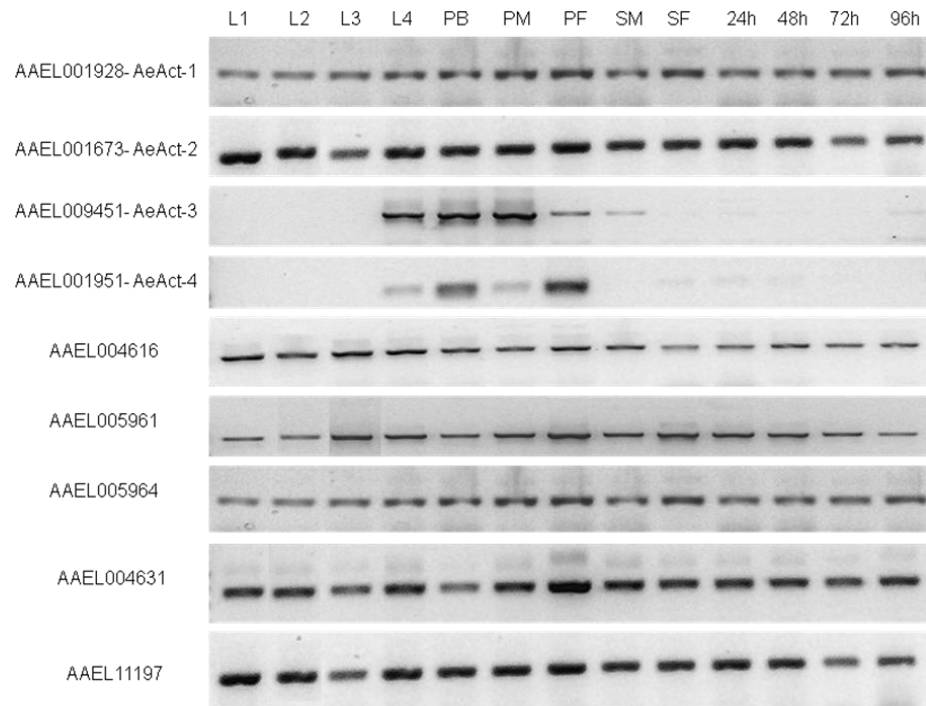


Figura 12 - Perfil de expressão de actina em *Aedes aegypti* - gel de agarose 1% mostrando o perfil de expressão dos nove genes de actina nas diversas fases do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. L1-L4: larva de primeiro à quarto estágio, PB: pupa branca (pupa recém pupada), PM: pupa macho, PF: pupa fêmea, SM: adulto macho alimentado apenas com solução de sacarose 10%, SF: adulto fêmea alimentado apenas com sacarose 10%, 24h-96h: adulto fêmea 24 á 96 horas após a alimentação sanguínea.

A análise realizada mostrou que dos 9 genes de actina, 7 genes se mostraram expressos em todas as fases analisadas do ciclo de vida do mosquito, e apenas 2 genes, AeAct-3 e AeAct-4 não se mostraram com expressões presentes em todos os intervalos analisados. Nós observamos que para o gene AeAct-3 houve uma grande expressão principalmente em pupa branca e pupa macho. Já para o gene AeAct-4 houve picos de expressão nas fases de pupas brancas e pupas fêmeas.

4.7 Análises in silico das regiões não traduzidas (UTR)

Após a obtenção do perfil transcricional semi-quantitativo dos nove genes de actina, foi observado que os iniciadores desenhados para esse experimento não serviriam para os experimentos de RT-PCR quantitativo, uma vez que amplificavam fragmentos muito maiores que 150 pares de base, o que interferiria na eficiência e realização da quantificação por qRT-PCR.

Portanto, para os experimentos de PCR em tempo real foram desenhados outros 9 pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene de actina. Esses iniciadores foram construídos na região 3'UTR dos genes candidatos, uma vez que foi observado que havia uma grande diferença nas sequências nucleotídicas para essa região (Figura 13) em todos os cDNAs dos genes de actina. Esses iniciadores foram construídos utilizando o programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e amplificavam fragmentos de aproximadamente 150 pares de base. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores senso e reverso sendo um par de iniciadores para cada cDNA candidato. Os alinhamentos de sequências nucleotídicas foram feitos usando o programa BioEdit (versão 7.0.9.0) (HALL, 1999) ou programa SeqMan II (DNASar-Lasergene).

	10	20	30	40	50
AAEL004616-RA	ACCC	TTCTTGGT	GTTACACA	ACTCTGATA	AAAATTGTTTCGGTAATA
AAEL001673-RA	GAAG	...ACCCC	.AACTC.TC	.AGCC.CT	.CTACTACTAC.TC.TGT.TT..
AAEL005961-RA	G..AC	.TCC	TCC.AA..CA	.TGCAGTTA.G	.GCATCGAA.GC..TT.GCCC
AAEL005964-RA	CATTGA	.A...AC	.A..TTTGTGTT	.TT..AAA	.ATTC.GGT.TTTC.
AAEL009451-RA	GGG	.CCT.GATC	.A.CACTGC	.A.CACACCC	.A.TA..AA.G.CG.CTGC..
AAEL004631-RA	G.G	.AG.CGCCG	.AACAA..GC	.A.AA..CCT	.CCCG...TGTTA.GTGTAC
AAEL001951-RA	G..GA	..CC.A.TG	..TG.TTA	.CATA.GCGACA	..GCCAGTG...GC.A
AAEL001928-RA	GTTAA	..C..AA	.AATAGG	..AAAGCCA	..G..CTACACACCTAG.CCCA..
AAEL011197-RA	G.ATC	..CCTA	.C...TTATTACTAAT	..T..CAACAACACTC	.TC..CCA
AAEL011197-RB	G.ATC	..CCTA	.C...TTATTACTAAT	..T..CAACAACACTC	.TC..CCA

Figura 13 – Alinhamento de fragmento dos cDNAs dos genes de actina na região 3'UTR mostrando a grande diferença na sequência nucleotídica.

4.8 Amplificações genômicas de fragmentos dos genes candidatos-oligonucleotídeos iniciadores desenhados na região não traduzida (3'UTR)

Os oligonucleotídeos iniciadores foram testados usando a reação da cadeia da polimerase (PCR) utilizando DNA genômico de *Aedes aegypti* como molde. Foi usado como controle positivo da reação o gene constitutivo H2B que amplifica um fragmento de 150 pares de base.

A confirmação da funcionalidade dos iniciadores foi feita comparando o tamanho dos fragmentos no gel de agarose com o tamanho dos fragmentos esperados. Como resultado, dos 9 pares de iniciadores específicos testados (Tabela 2), todos renderam fragmentos amplificados com especificidade (Figura 14).

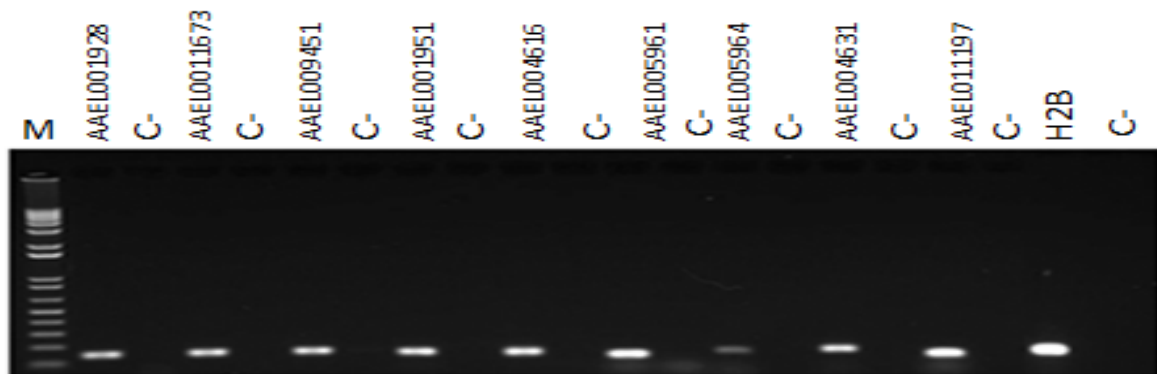


Figura 14 - Gel de agarose 1% mostrando os fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados - Observamos amplificação específica de fragmentos para todos os iniciadores. C: controle negativo, C+: Controle positivo (iniciador para o gene H2B usando como molde DNA genômico) M: Marcador molecular de pares de bases 1Kb plus (Invitrogen)

4.9 Análises quantitativas de acúmulo de transcritos dos genes de actina de *Aedes aegypti*

Os resultados semi-quantitativos em relação ao acúmulo de transcritos dos genes de actina permitiram a prévia confirmação dos perfis de expressão dos 4 genes de actina já descritos em trabalhos. Porém uma análise mais precisa desse acúmulo de transcritos se mostra necessária. Portanto, a técnica quantitativa de RT-

PCR em tempo real foi empregada para avaliar os níveis de transcrição, utilizando método absoluto de quantificação.

4.9.1 Clonagem e obtenção de DNA de plasmídeos para elaboração de curvas-padrão

Para construção de curvas-padrão necessárias à quantificação absoluta do acúmulo de transcritos dos genes de actina, o DNA de plasmídeos contendo fragmentos dos transcritos de cada gene com tamanhos aproximados de 150 pb foram produzidos. Para tanto, moldes de cDNA sintetizados a partir de RNA total de diversos estágios de desenvolvimento do mosquito foram utilizados nas reações de PCR com 1 par de iniciadores específicos para cada um dos genes candidatos, descritos na Tabela 3. Os fragmentos foram amplificados (Figura 15) e foram ligados aos braços do vetor de clonagem pCR[®] 2.1 (Invitrogen).

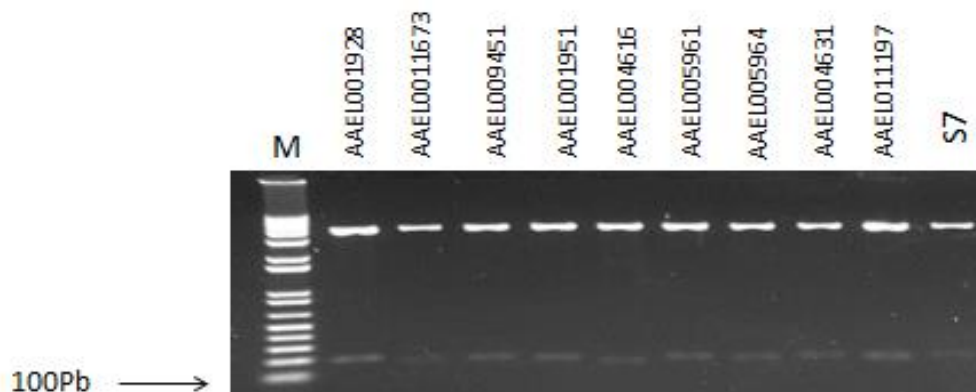


Figura 15 – Gel de agarose 1,2% dos produtos de digestão do DNA de plasmídeos - DNA de plasmídeos contendo insertos de fragmentos dos genes de actina (~ 150 pb), foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* para liberação dos insertos. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e então corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

O DNA foi inserido em bactérias DH10B e o DNA dos plasmídeos purificados foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* para visualização dos clones positivos. Na Figura 15 podem ser evidenciadas 2 bandas, sendo as maiores (~3.9 kb) correspondentes ao vetor pCR[®] 2.1 sem inserto, e as menores correspondentes aos

insertos liberados (~150 pb), respectivos aos fragmentos de cDNA de cada transcrito amplificado por RT-PCR. Os 10 clones obtidos foram sequenciados e confirmados por similaridade com as sequências depositadas nos bancos GenBank e VectorBase. O DNA dos plasmídeos foi linearizado por digestão com a enzima de restrição *Xba*I (Figura 16) e foi utilizado nos experimentos de RT-PCR em tempo real.

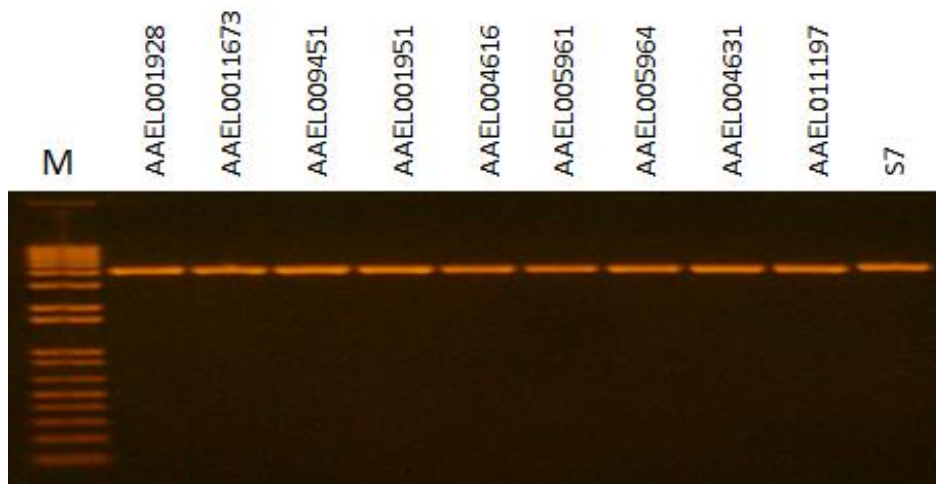


Figura 16- Gel de agarose 1% mostrando os plasmídeos linearizados onde foram clonados os genes de actina para geração das curvas-padrão gene específicas - Plasmídeos contendo insertos de fragmentos dos genes de actina de aproximadamente 150 pb. O DNA de plasmídeos foi digerido com a enzima de restrição *Xba*I para linearização. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,2%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1Kb plus (Invitrogen).

Os valores das concentrações de todos os DNA de plasmídeo linearizado contendo o inserto foram utilizados no cálculo do número de cópias através da fórmula descrita em Material e Métodos (Item 3.8.1) e para cada gene estudado, uma curva-padrão de quantificação foi produzida através de diluições seriadas do DNA de plasmídeos, como no exemplo da figura 16. As reações com iniciadores específicos, contendo plasmídeos linearizados nas diferentes diluições ou cDNA das amostras como molde, foram submetidas simultaneamente aos ciclos de amplificação para a análise quantitativa e o número de cópias do cDNA de cada amostra foi estimado a partir das curvas-padrão de cada gene, geradas pelo programa Mastercycler ep realplex 1.5 (Eppendorf).

Diluições seriadas

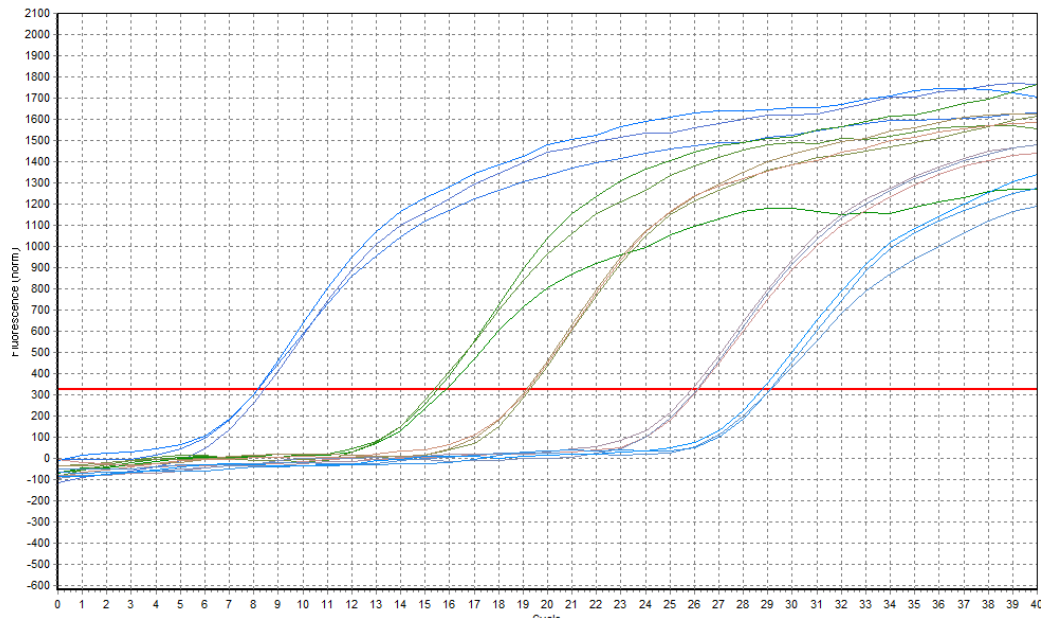


Figura 17 - Exemplo de quantificação do número de cópias para cada gene estudado através da técnica de RT-PCR em tempo real - O gráfico mostra medições em triplicata de 5 diluições seriadas contendo cópias de plasmídeo que possui o fragmento do gene a ser quantificado.

4.9.2 Perfis quantitativos de transcrição dos genes de actina

Análises das curvas de dissociação (melting curve) (Figura 18) referentes às amostras controle e experimentais foram realizadas para certificação da especificidade dos fragmentos amplificados (amplicons) e, tanto para os genes alvo quanto para o controle endógeno, somente houve validação das análises quando as amostras apresentaram pico único no gráfico. Além disso, nenhum sinal fluorescente foi detectado nos controles negativos (reações sem cDNA ou DNA de plasmídeo como molde) dos ensaios utilizados para a análise quantitativa de acúmulo de transcritos.

Os experimentos para quantificação dos níveis de transcrição por RT-PCR em tempo real foram realizados para os 9 genes de actina sob estudo. Todos os 9 genes analisados apresentaram curvas de dissociação com pico único, indicando especificidade dos amplicons gerados.

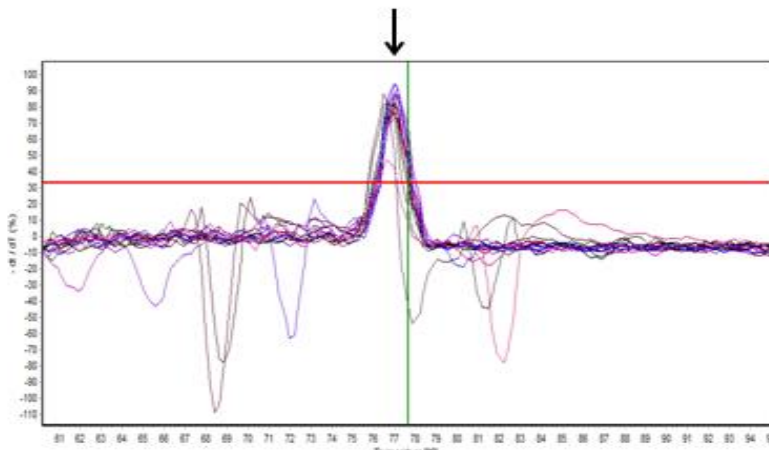


Figura 18 - Exemplo de curvas de dissociação obtidas nos experimentos de quantificação dos genes analisados em aparelho Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf). O gráfico mostra curvas de dissociação de amostras de cDNA do gene AAEL01673 amplificadas nos experimentos de RT-PCR em tempo real. A seta indica o único pico formado, mostrando especificidade dos fragmentos amplificados.

Inicialmente foi escolhido o método de quantificação absoluta para a análise dos 9 genes de actina. Com este método, foram obtidos os números de cópias dos transcritos alvos por μg de RNA. Para refinar a análise do acúmulo de transcritos destes genes e excluir possíveis erros da quantificação absoluta provenientes da qualidade ruim de cDNAs utilizados como moldes, foram utilizados os números de cópias de acúmulo de transcritos do gene ribossômico S7 nos 12 pontos definidos para confirmação da integridade das amostras e normalização do número de cópias dos transcritos estudados, sendo uma estratégia já abordada em outros trabalhos de fisiologia molecular de *Aedes aegypti* já publicados (CHEN et al., 2004; ZHU et al., 2007).

O gene ribossômico S7 foi adotado e validado em cada análise como controle endógeno através de teste estatístico, com o requerimento de não apresentar variações significativas entre os pontos amostrais. Desta forma, o número de cópias de transcritos deste gene foi usado para normalizar variações na concentração de cDNA total.

A quantificação do acúmulo de transcritos do gene S7 seguido de uma análise estatística (item 3.9) mostrou que não havia diferença significativa entre estágios imaturos do mosquito (Figura 17B). O mesmo acontecia ao compararmos as formas adultas do mosquito (Figura 17C). Já quando foram comparados todos os pontos amostrais (imaturos e adultos) verificou-se diferença significativa (Figura

17A), o que impossibilitou o uso deste gene com um normalizador de forma direta, aplicável em todos os estágios de vida do mosquito. Sendo assim, nossa estratégia para o uso do gene S7 como normalizador foi dividir a normalização do acúmulo de transcritos dos pontos amostrais entre imaturos e adultos, uma vez que não havia diferença significativa entre esses grupos para o gene S7.

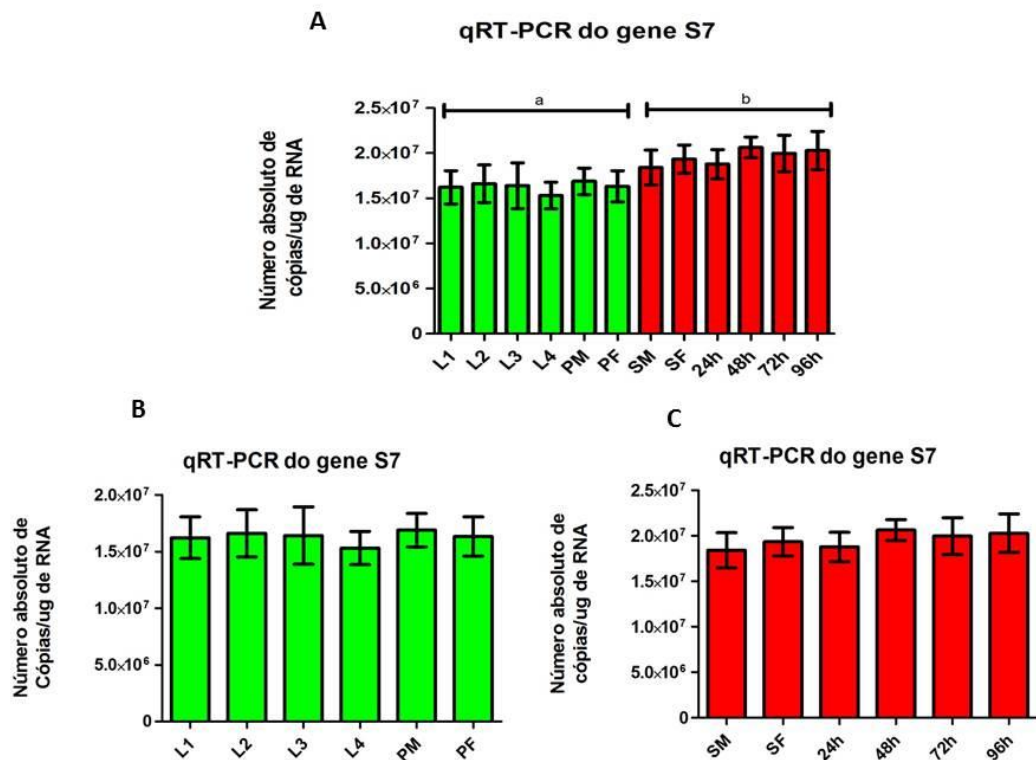


Figura 19 – Quantificação absoluta do acúmulo de transcritos do gene AAEL009496-S7 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

- A. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AAEL009496-S7 em todos os 12 intervalos analisados.
- B. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AAEL009496-S7 em formas imaturas do mosquito.
- C. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AAEL009496-S7 em formas adultas do mosquito.

O número de cópias de mRNA foi determinado por comparação com concentrações conhecidas de DNA de plasmídeo contendo o fragmento do transcrito de interesse. O RNA total foi extraído de larvas de primeiro à quarto estadio (L1-L4), pupa macho (PM), pupa fêmea (PF), mosquitos adultos alimentados com sacarose, machos (SM) e fêmeas (SF) e fêmeas 24-96horas após o repasto sanguíneo (24h,48h,72h e 96h). Foram feitos 3 experimentos independentes, e cada intervalo amostral foi medido 3 vezes. Os dados representam valores médios e as barras de erros indicam o desvio-padrão. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos imaturos somente (L1, L2,L3,L4,PM,PF) (Teste de Tukey, $p > 0.05$). e entre os grupos de mosquitos adultos somente (SM,SF,24h,48h,72h,96h) (Teste de Tukey, $p > 0.05$). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

Após a validação do gene AAEL009496-S7 como gene normalizador, foi feito a quantificação do acúmulo de transcritos para os 9 genes de actina, primeiramente de forma absoluta e depois relativa. Para as figuras de número 20 à 29 segue-se a

mesma legenda, disponibilizada na tabela abaixo (Tabela 5). Para todas essas figuras também se aplica que o número de cópias de mRNA foi determinado por comparação com concentrações conhecidas de DNA de plasmídeo contendo o fragmento do transcrito de interesse e a normalização foi realizada contra o número de cópias do gene S7. Foram feitos 3 experimentos independentes, e cada intervalo amostral foi medido 3 vezes. Os dados representam valores médios e as barras de erros indicam o desvio-padrão.

Tabela 5: Legenda dos gráficos de número 20 á 29

Abreviações	Significados	Número de indivíduos que foram usados para extração de RNA total
L1	Larvas de primeiro estadio	100
L2	Larvas de segundo estadio	100
L3	Larvas de terceiro estadio	50
L4	Larvas de quarto estágio	10
PM	Pupa macho	10
PF	Pupa fêmea	10
SM	Mosquitos adultos machos alimentados com sacarose	10
SF	Mosquitos adultos fêmeas alimentados com sacarose	10
24h	Fêmeas 24 horas após o repasto sanguíneo	10
48h	Fêmeas 48 horas após o repasto sanguíneo	10
72h	Fêmeas 72 horas após o repasto sanguíneo	10
96h	Fêmeas 96 horas após o repasto sanguíneo	10

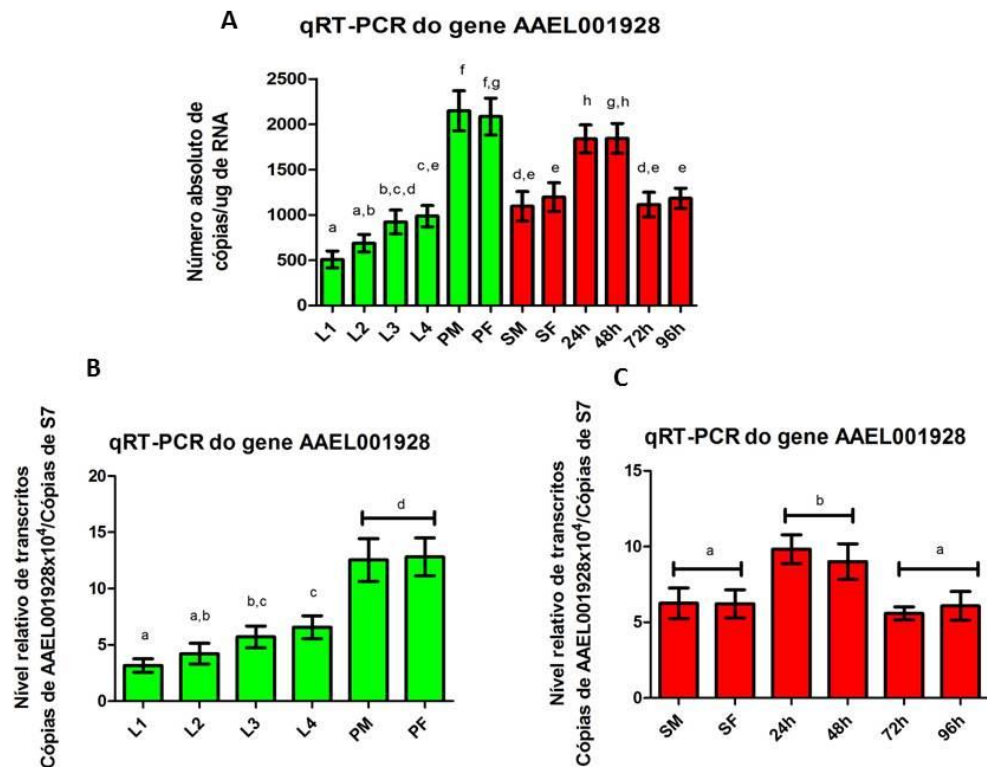


Figura 20 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL001928 (AeAct-1) por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti* - Quantificação absoluta dos transcritos do gene AAEL001928 (AeAct-1) em todas as fase dos mosquitos (A). Quantificação relativa nas formas imaturas (B) ou aladas (C). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey $p < 0.05$).

Os experimentos utilizando RT-PCR em tempo real indicaram que o gene AAEL001928 (Figura 20) possui uma crescente no acúmulo do número de transcritos nas fases imaturas, com um grande aumento em pupas. Na fase adulta esse aumento ocorre de forma mais amena em fêmeas 24 e 48 horas após o repasto sanguíneo. Esse gene já foi estudado por Ibrahim et al. (1996) se mostrando como uma actina muscular de expressão constitutiva, através de outros métodos menos refinados para o estudo de expressão gênica.

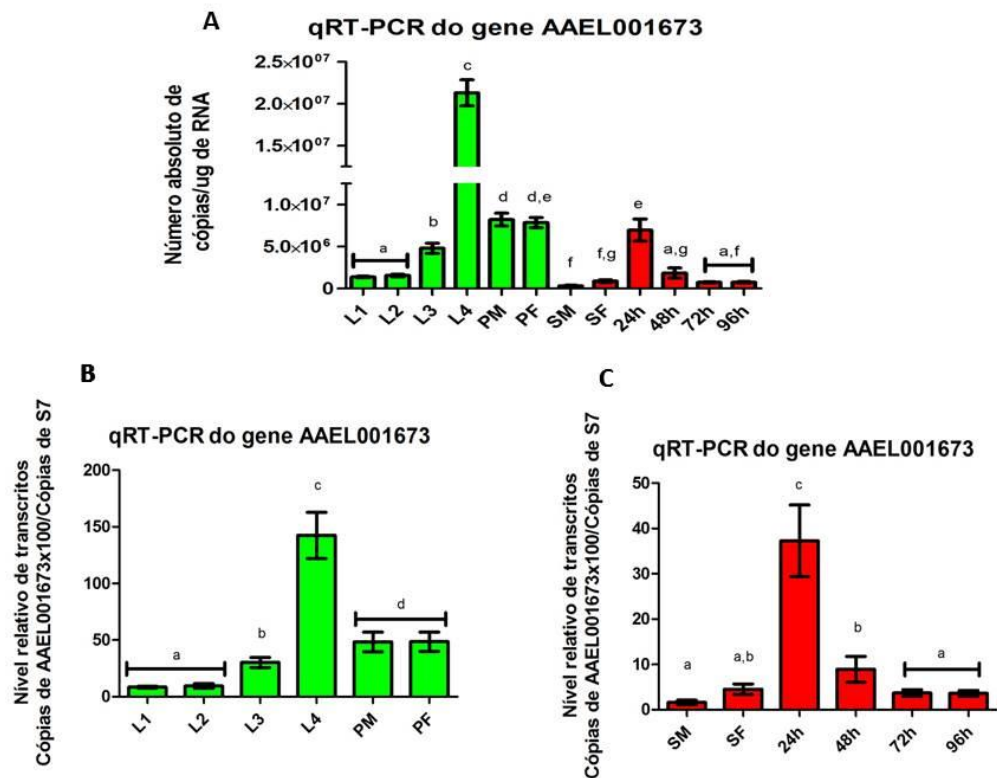


Figura 21 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AEEL001673 (AeAct-2) por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AEEL001673 (AeAct-2) em todas as fases do mosquito (A). Quantificação relativa nas formas imaturas (B) ou aladas (C). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

A quantificação dos transcritos do gene AEEL001673 (Figura 21) mostrou um acúmulo crescente do número de transcritos em larvas, onde observamos um pico de indução em larvas de quarto estadio, esse acúmulo então sofre uma queda na fase de pupas. Nas fases adultas dos mosquitos observamos um pico de indução em fêmeas 24 horas após o repasto sanguíneo e uma posterior queda desse acúmulo nas horas seguintes. O gene AEEL001673 já foi mostrado em estudos anteriores como sendo um gene de expressão constitutiva e com picos de indução em larvas (VYAZUNOVA; LAN, 2004).

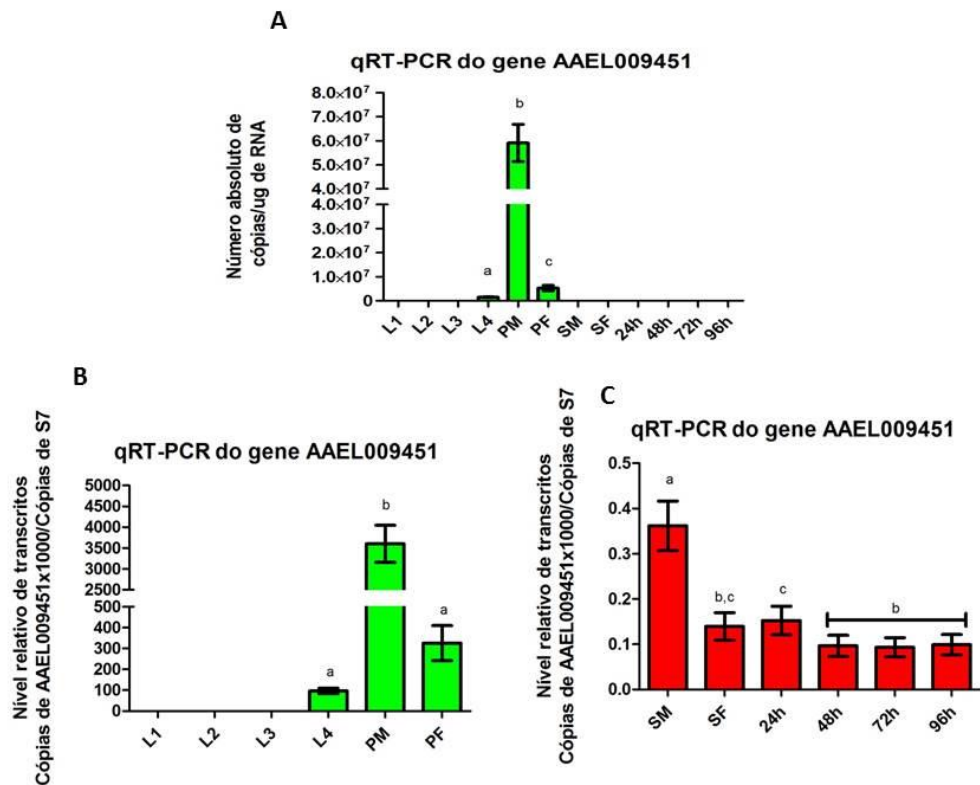


Figura 22 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AEEL009451 (AeAct-3) por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AEEL009451 (AeAct-3) em todas as fases do mosquito (A). Quantificação relativa nas formas imaturas (B) ou aladas (C). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

Para o gene AEEL009451 (Figura 22) foi observado números muito baixos de acúmulo de transcritos até larvas de terceiro estagio. Foi mostrada também uma indução brusca no aumento de transcrição desse gene em pupas macho. Nas fases adultas do mosquito o experimento mostrou um nível de acúmulo dos transcritos maior em machos, embora esse número fosse muito menor que em pupas macho. Vyazunova e Lan (2004), já havia mostrado a brusca indução desse gene em pupas macho e caracterizado essa actina como uma actina muscular altamente expressa em machos.

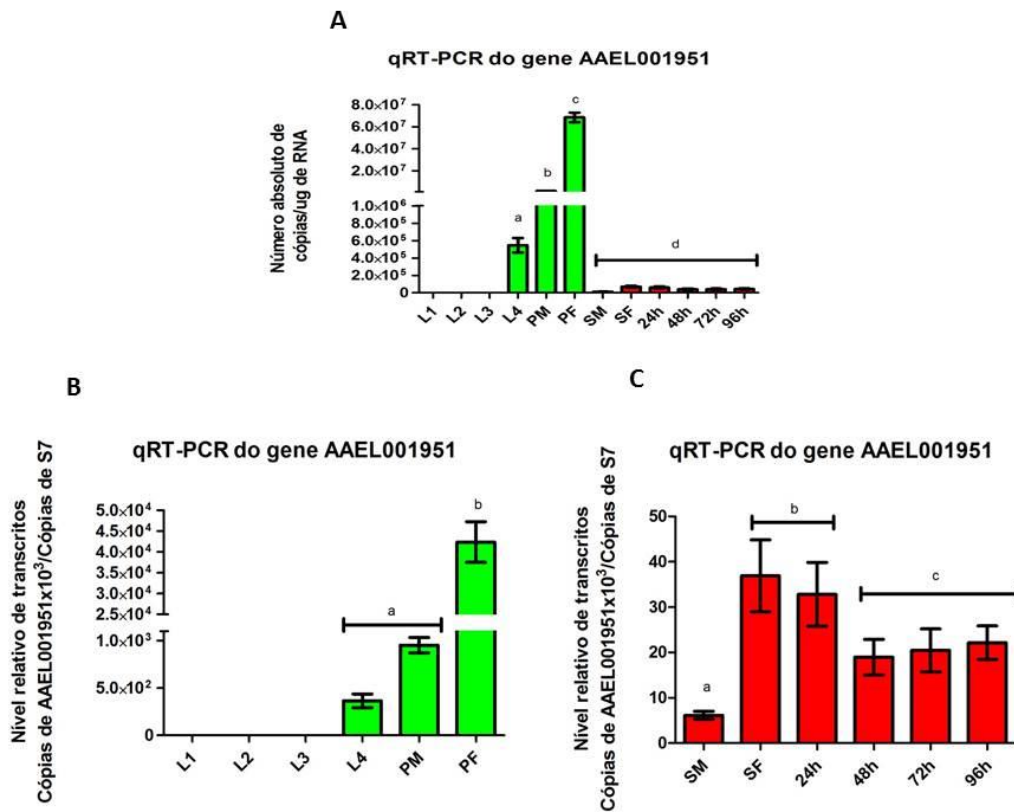


Figura 23 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AEEL001951 (AeAct-4) por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AEEL001951 (AeAct-4) em todas as fases do mosquito (A). Quantificação relativa nas formas imaturas (B) ou aladas (C). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

O gene AEEL001951 se mostrou com baixíssimos acúmulos de transcritos até larvas de terceiro estadio (Figura 23), e com um grande pico de indução em pupa fêmea. Em mosquitos adultos o RT-PCR em tempo real mostrou maior acúmulo de transcritos em fêmeas, principalmente antes do repasto sanguíneo e 24 horas após a alimentação, embora esses números sejam muito menores comparados ao acúmulo em pupa fêmea. O gene AEEL001951 já havia sido descrito por Muñoz et al (2004) como um gene de alta expressão em pupas fêmeas. É interessante notar também a significativa expressão deste gene em pupas macho, embora haja uma grande diferença no acúmulo do número de transcritos entre pupas machos e pupas fêmeas.

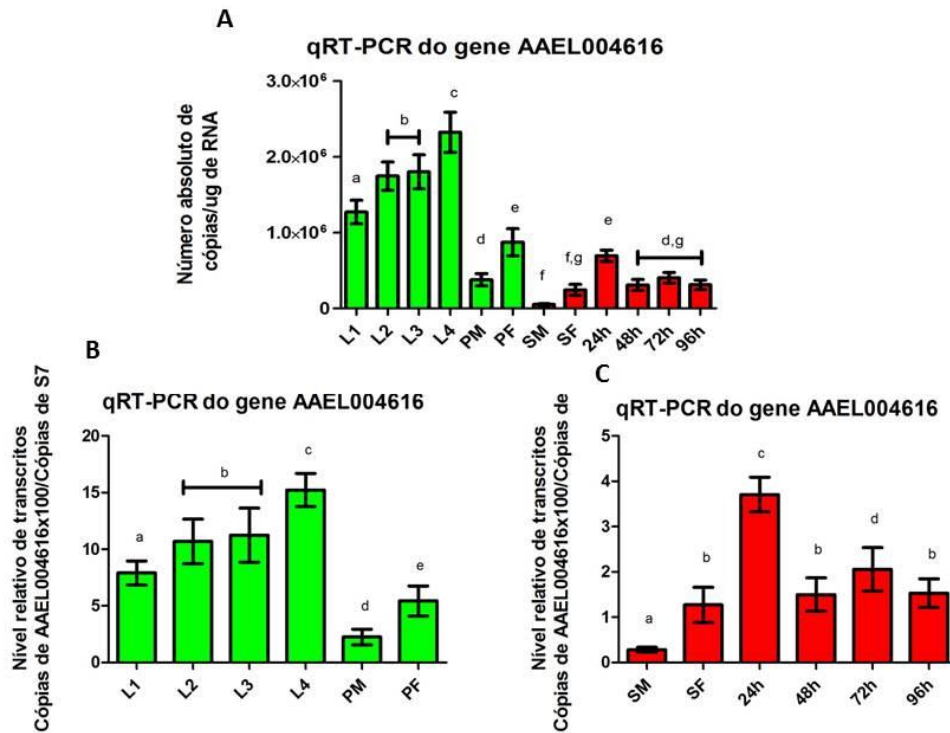


Figura 24 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AEEL004616 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AEEL004616 em todas as fases do mosquito (A). Quantificação relativa nas formas imaturas (B) ou aladas (C). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

Os experimentos utilizando RT-PCR em tempo real indicaram que o gene AEEL004616 (Figura 24), possui picos de indução em larvas de primeiro a quarto estágio, sofrendo uma queda em pupas. Já na fase adulta os transcritos se mostraram mais acumulados em fêmeas 24 horas após o repasto sanguíneo.

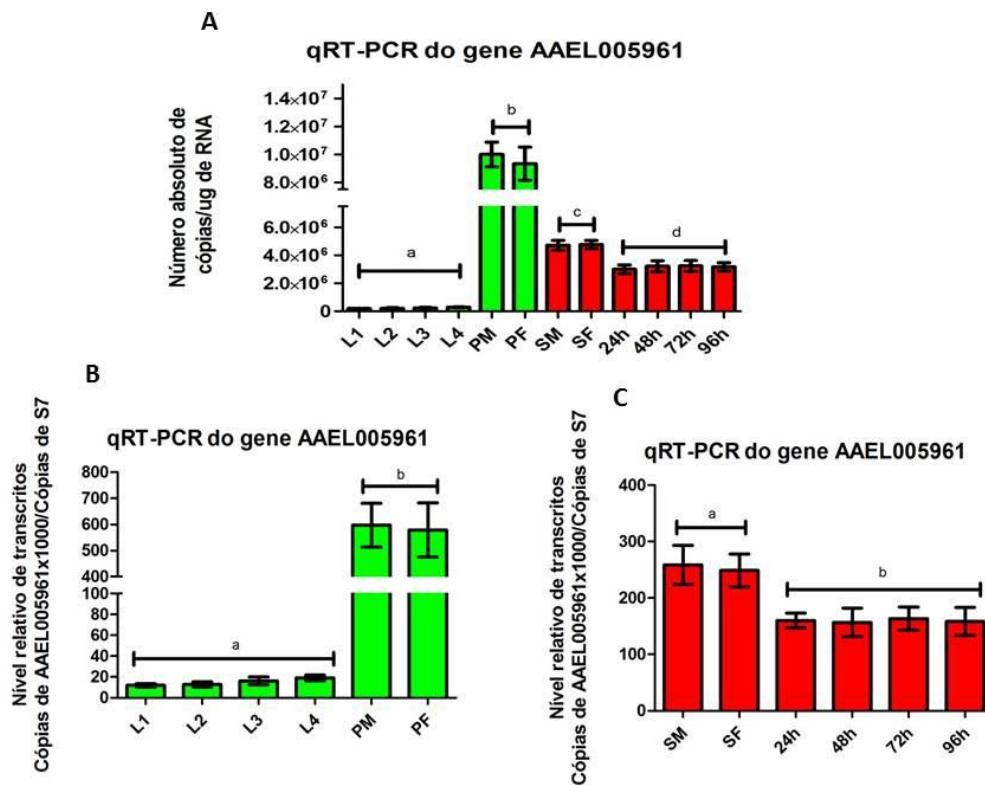


Figura 25 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL005961 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AAEL0015961 em todas as fases do mosquito (A). Quantificação relativa nas formas imaturas (B) ou aladas (C). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

A quantificação dos transcritos para o gene AAEL005961 (Figura 25) indicou baixos níveis em larvas com picos de indução em pupas. Nas fases adultas foi observado um maior acúmulo dos transcritos em mosquitos alimentados apenas com sacarose com uma pequena queda em fêmeas alimentadas com sangue, onde esse acúmulo permanece constante até o final dos intervalos observados.

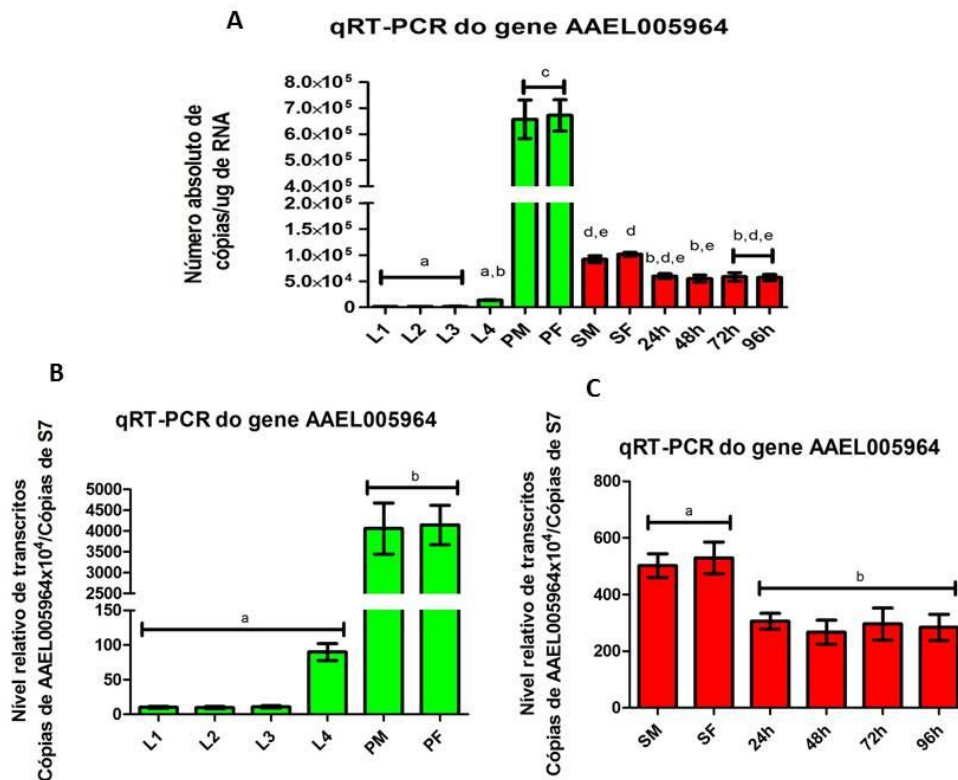


Figura 26 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AEEL005964 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AEEL005964 em todas as fases do mosquito (A). Quantificação relativa nas formas imaturas (B) ou aladas (C). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

O gene AEEL005964 se mostrou com baixo acúmulo de transcritos nas fases de larvas de primeiro a quarto estadio quando analisados por RT-PCR em tempo real (Figura 26), e um grande aumento na transcrição desse gene é realizado na fase de pupa. Em adultos o maior acúmulo de transcritos é visto em mosquitos antes do repasto sanguíneo, embora não haja grande diferença para os intervalos de mosquitos alimentados com sangue.

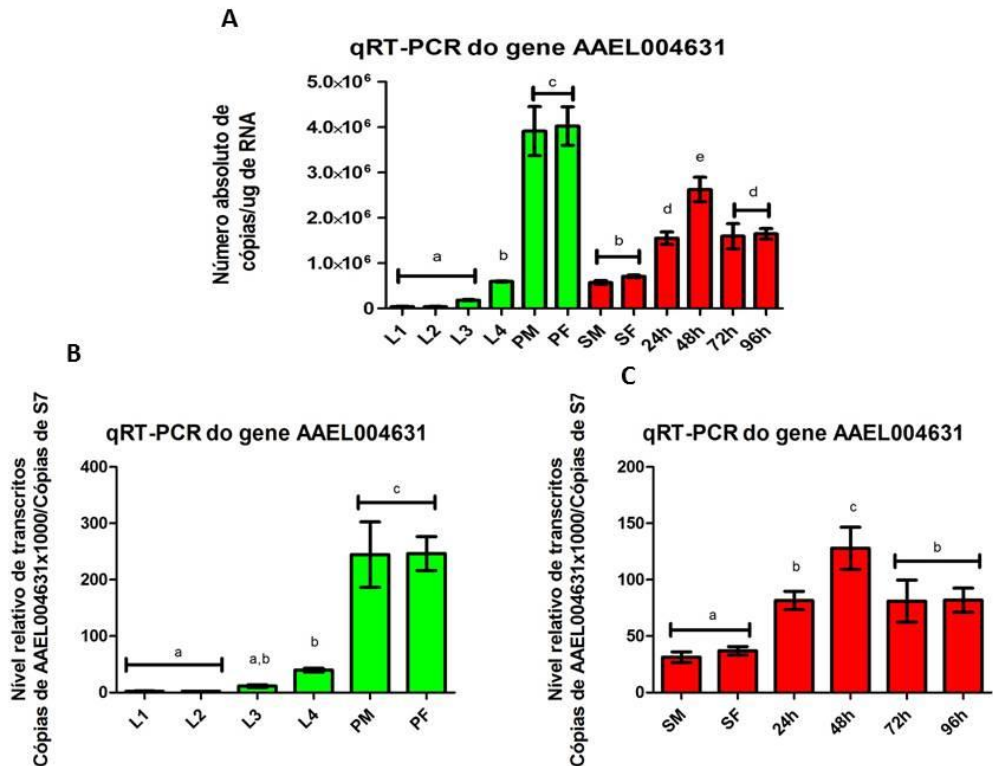


Figura 27 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL004631 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AAEL004631 em todas as fases do mosquito (A). Quantificação relativa nas formas imaturas (B) ou aladas (C). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

O RT-PCR real time indicou um acúmulo crescente do número de transcritos para o gene AAEL004631 (Figura 27) nas fases de larvas, e um pico de indução na fase de pupa. Para as fases adultas, o maior acúmulo no número de transcritos para esse gene se mostrou em fêmeas 48 horas após o repasto sanguíneo, ocorrendo uma queda desse acúmulo 72 e 96 após a alimentação sanguínea.

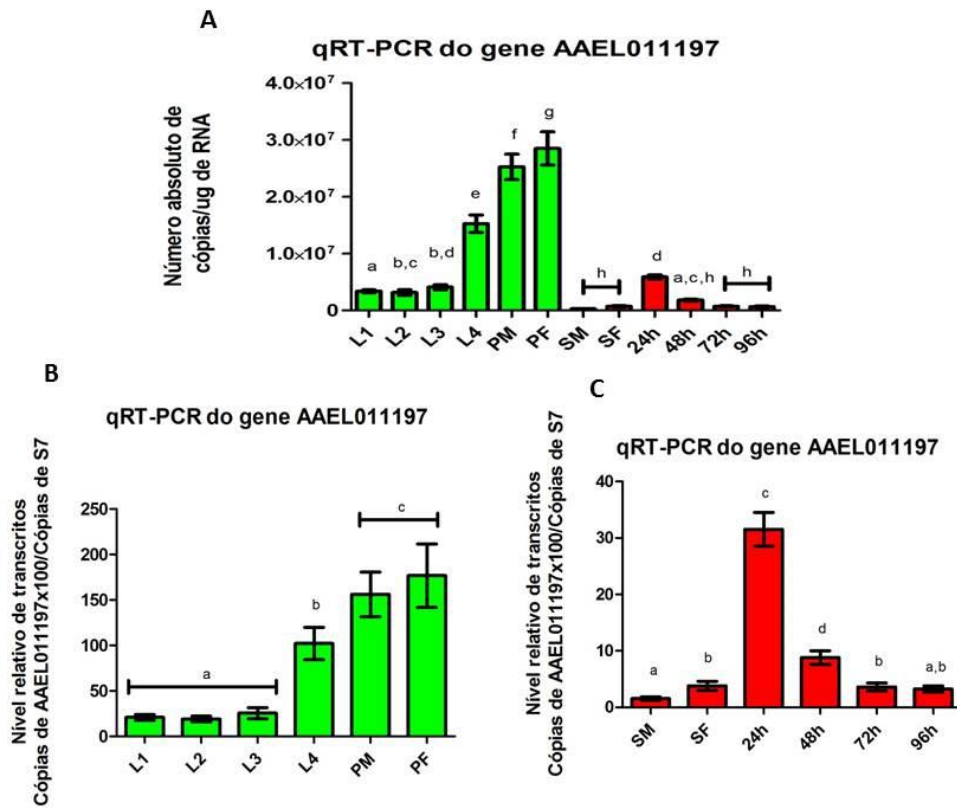


Figura 28 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AEEL011197 por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Quantificação absoluta dos transcritos do gene AEEL011197 em todas as fases do mosquito (A). Quantificação relativa nas formas imaturas (B) ou aladas (C). Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

A quantificação do gene AEEL011197 (Figura 28) indicou uma crescente no nível de acúmulo de transcritos em larvas, com transcrições muito aumentadas em larvas de quarto instar e principalmente em pupas. Para a fase adulta do mosquito, o experimento de RT-PCR em tempo real indicou baixa transcrição em mosquitos sem alimentação sanguínea e pico de indução em fêmeas 24 horas após o repasto. Esse acúmulo do número de transcritos sofreu uma queda ao longo das horas após as 24 horas depois do repasto.

O acúmulo do número de transcritos analisados para os genes de actina indicou que para todos os genes, os picos de indução se encontravam ou em pupas

ou em larvas de quarto estadio. Dos 9 genes, 7 tiveram na fase de pupa o maior acúmulo de transcritos e 2 tiveram esse acúmulo em larvas de quarto estadio. Na fase adulta do mosquito observamos que os picos de indução se distribuíram entre mosquitos sem repasto sanguíneo e mosquitos fêmeas 24 e 48 horas após o repasto (Figura 29).

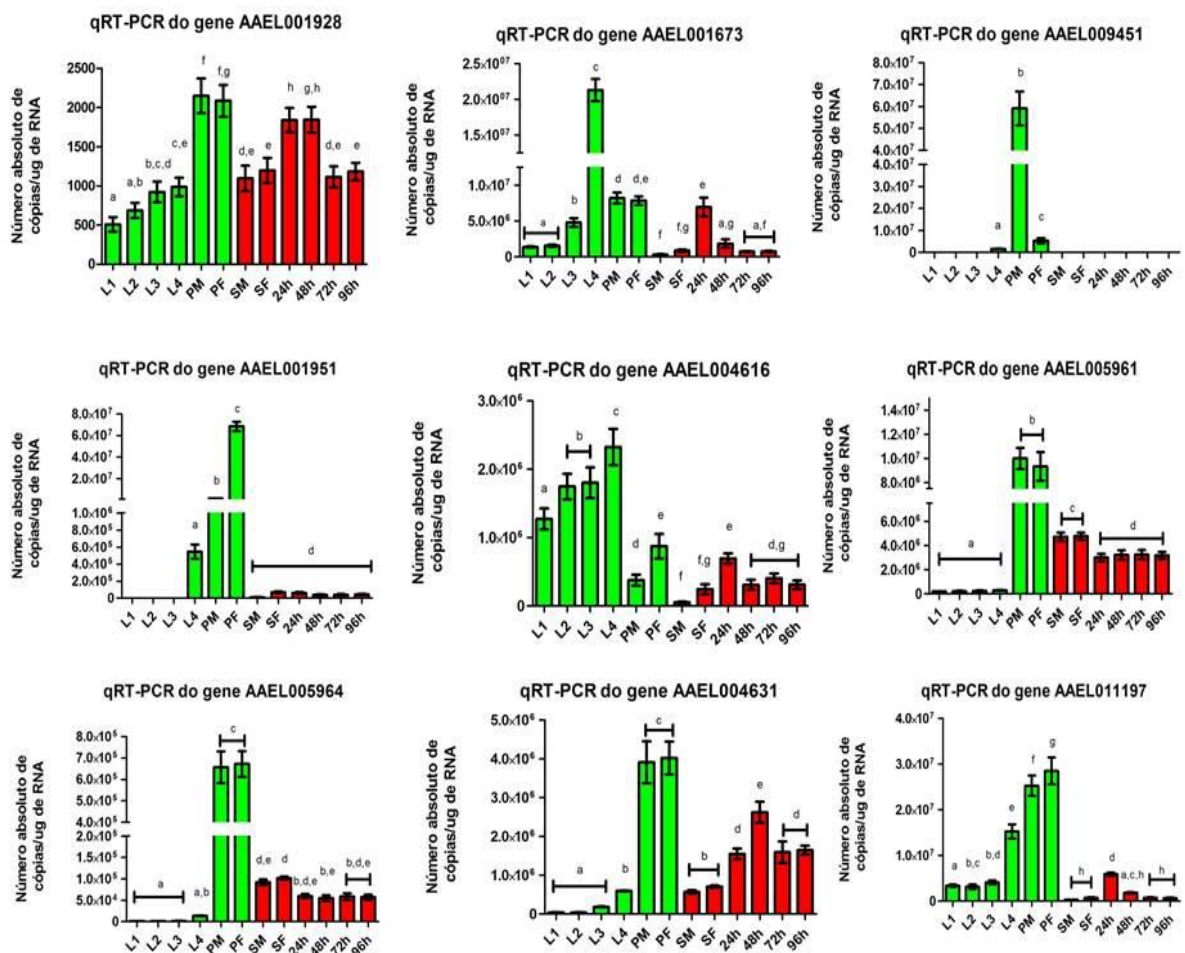


Figura 29 – Paineis gerais da quantificação absoluta dos transcritos dos nove genes de actina em *Aedes aegypti* por RT-PCR em tempo real nas diversas fases do ciclo de vida do mosquito. Letras diferentes sobre as barras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

O gene que apresentou maior expressão foi o AAEL001951 (AeAct-4), altamente expresso em pupas fêmeas, seguido do gene AAEL009451 (AeAct-3) altamente expresso em pupas machos e do gene AAEL011197 muito expresso em pupas fêmeas. O gene AAEL001928 (AeAct-1) foi o gene que apresentou menor expressão entre os nove genes de actina, seguido do gene AAEL005964 (Tabela 6).

Tabela 6: Ranking do acúmulo do número de transcritos dos genes de actina em *Aedes aegypti* em ordem decrescente com os respectivos picos de indução.

Gene	Pico de indução	Valor aproximado da média no pico de indução
AAEL001951(Act-4)	Pupa fêmea	$6,8 \times 10^7$
AAEL009451(Act-3)	Pupa macho	$5,9 \times 10^7$
AAEL011197	Pupa fêmea	$2,8 \times 10^7$
AAEL001673(Act-2)	Larva de 4° estadio	$2,1 \times 10^7$
AAEL005961	Pupa macho	$1,0 \times 10^7$
AAEL004631	Pupa fêmea	$4,0 \times 10^6$
AAEL004616	Larva de 4° estadio	$2,3 \times 10^6$
AAEL005964	Pupa fêmea	$6,7 \times 10^5$
AAEL001928(Act-1)	Pupa macho	$2,1 \times 10^3$

Podemos notar que alguns genes de actina se destacam no que se refere ao acúmulo do número de transcritos em alguns intervalos analisados. Em larvas observamos o destaque dos genes AeAct-2 e AAEL011197, principalmente em larvas tardias.. Em pupas os genes Act-3 e Act-4 são os que mais se destacam em machos e fêmeas respectivamente, seguido do gene AAEL011197. E por fim em adultos observamos o destaque do gene AeAct-2 em fêmeas 24 horas após o repasto, seguido do gene AAEL011197 nesse mesmo intervalo. Os genes

AAEL005961 também se destaca em todos os intervalos em mosquitos adultos analisados, seguido do gene AAEL004631 (Figura 30).

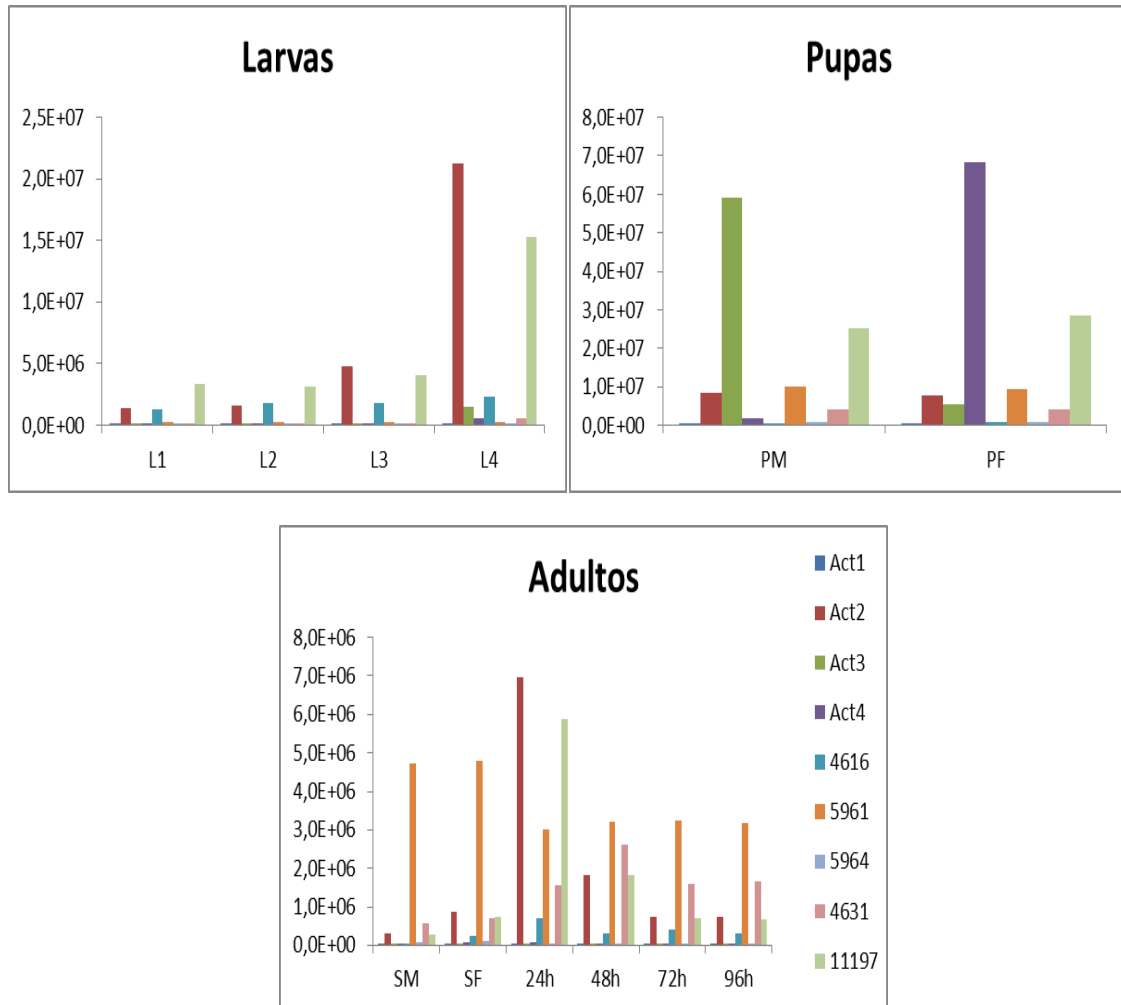


Figura 30 – Acúmulo do número de transcritos dos genes de actina ao longo do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.

5 DISCUSSÃO

Estudos focados na biologia molecular básica de insetos vetores de doenças, tem se tornado cada vez mais frequentes, devido à importância médica desses organismos na transmissão de patógenos ao homem. O aprofundamento nesses estudos é ponto fundamental para a elaboração de estratégias inovadoras de controles desses insetos vetores (MEGY et al., 2009; WATERHOUSE et al., 2008).

Nos últimos anos, com o avanço de técnicas moleculares e da engenharia genética, a possibilidade desse tipo de estudos tem se tornado cada vez mais comum e acessível à comunidade científica em todo mundo. A informação genômica contida em banco de dados também tem ajudado muito no interesse e avanço nesse tipo de pesquisas, bem como a conclusão de projetos de sequenciamentos de genomas de diversos insetos vetores de doenças.

O mosquito vetor dos quatro sorotipos da dengue e também do vírus da febre amarela, o *Aedes aegypti*, tem se mostrado importante foco de estudo de biologia molecular básica, devido à grande incidência de dengue nos países subtropicais. Outro fator para o crescimento de publicações recentes utilizando esse organismo modelo é a facilidade da manutenção desse inseto em laboratório.

Neste contexto, o presente estudo utilizou-se de informações previamente contidas em bancos de dados, sobre genes anotados como actinas de *Aedes aegypti*. A sequência nucleotídica de cada actina foi analisada para a construção de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene. Esses iniciadores construídos foram usados para gerar os perfis de transcrição dos 9 genes de actina.

Vários genes de actina em dípteros têm sido estudados. Em *Drosophila melanogaster* foi relatado a existência 6 genes de actina (BERNSTEIN et al., 1993 e MOUNIER; SPARROW, 1993). Em mosquitos o estudo do perfil de expressão desses genes também tem sido feito, em *Anopheles gambiae* 5 genes de actina foram identificados (Salazar et al., 1994). Já em *Aedes aegypti* não temos relatos de muitos trabalhos publicados. Sabe-se da existência de nove genes de actina em *Aedes aegypti*, mas desses nove genes apenas 4 são relatados em publicações científicas como genes já caracterizados quanto a seu perfil de expressão. Vale ressaltar que nesses estudos onde foram gerados os perfis de expressão dessas 4

actinas de *Aedes aegypti*, em todos eles, as técnicas usadas não foram técnicas precisas para quantificação, e sim técnicas semi-quantitativas.

Nesse presente estudo, antes da geração quantitativa do perfil de expressão de cada actina, foi feita uma prévia desses perfis através de uma técnica semi-quantitativa. Por RT-PCR confirmou-se o perfil de expressão dos 4 genes de actina já descritos em trabalhos, sendo dois (AeAct-1 e AeAct-2) expressos em todas as fases do ciclo de vida do mosquito e dois com picos de indução estágio-específicos (AeAct-3 e AeAct-4). Os outros cinco genes que ainda não haviam sido descritos na literatura se mostraram presentes em todos os intervalos analisados.

Na geração dos perfis de expressão quantitativos para os genes de actina, observamos acúmulo de transcritos em todos os estágios analisados ao longo do ciclo de vida do mosquito para todas as nove actinas, embora em alguns intervalos esse acúmulo se mostrasse muito baixo.

O gene AAEL001928 (AeAct-1) se apresentou como um gene constitutivo, embora apresente diferenças significativas no número de acúmulo de transcritos entre diversos intervalos. Ibrahim et al. (1996) já havia descrito esse gene como um gene de expressão constitutiva e mais recentemente Araujo e colaboradores (2011) validou esse gene como um gene de referência, podendo ser usado como controle endógeno. Nós verificamos que o gene AAEL001928 (AeAct-1) apresentou entre todos os genes de actina analisados, níveis de expressão mais baixos, e uma menor variação dos níveis de acúmulo de transcritos. Esses fatores nos indicaram que o gene AAEL001928 é o gene de actina com a expressão mais estável entre os diversos estágios do mosquito.

Outro gene já relatado em estudos e que foi por nós analisado por qRT-PCR, foi o gene AAEL001673 (AeAct-2), descrito por Vyazunova e Lan (2004). Esse gene foi anteriormente descrito como altamente expresso em larvas de terceiro estágio, mas nós observamos picos maiores de expressão em larvas de quarto estágio. O fato de usarmos uma técnica mais refinada e precisa de quantificação (HUGGETT et al., 2005) nos deu outro perfil de expressão desse gene, comparado ao que já havia sido relatado por Vyazunova e Lan. Embora os picos de indução desse gene em nosso trabalho e na literatura se mostraram nas fases de larva do mosquito, havendo diferença apenas no número de horas de vida das larvas.

O acúmulo de transcritos do gene AAEL009451 (AeAct-3) se mostrou com uma enorme indução em pupas machos. Em pupas fêmeas esse acúmulo se

mostrava muito menor, indicando assim uma expressão estágio-específico desse gene. Vyazunova e Lan (2004) já havia demonstrado o perfil transcricional desse gene, usando técnicas menos precisas para a quantificação de transcritos. O gene AAEL009451 foi o primeiro gene de actina de expressão estágio-específico em mosquitos descrito na literatura. Esse gene foi o que apresentou também maior diferença do número de acúmulo de transcritos, deixando bem claro sua expressão estágio-específico.

Análises do gene AAEL001951(AeAct-4) confirmaram o perfil de expressão descrito por Muñoz e colaboradores(2004) como um gene altamente expresso em pupas fêmeas. Esse gene se mostrou como o gene de maior acúmulo de transcritos entre todos os genes de actina analisados. Muñoz e colaboradores (2004) também relatou que esta actina se encontrava no músculo de voo do mosquito, similarmente ao que acontece com o gene AAEL009451 (AeAct-3) em machos, descrito por Vyazunova e Lan (2004) como uma actina presente no tórax do mosquito. É muito interessante relatar também que nós observamos uma significativa expressão desse gene em pupas macho, embora o número de acúmulo desse transcrito fosse muito maior em pupas fêmeas.

Em 2010 Fu e colaboradores publicaram um trabalho onde eles usaram o promotor do gene AeAct-4 para a construção de um gene quimérico a fim de usar esse gene na transgenia de mosquitos, visando à supressão de população de *Aedes aegypti*. No ano de 2013, Facchinelli e colaboradores publicaram um trabalho onde eles estudaram a viabilidade de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos criados em grandes gaiolas, simulando uma vida selvagem desses insetos. A construção transgênica utilizada na transgenia desses mosquitos possuía o promotor da gene AeAct-4. Facchinelli e colaboradores observaram que havia uma perda de fitness em mosquitos machos transgênicos, principalmente no que se referia a cópula desses machos com fêmeas selvagens. A essa perda de fitness por parte dos mosquitos machos transgênicos nós atribuímos que uma possível explicação possa estar na significativa expressão do gene AeAct-4 em pupas machos, observado por nós na quantificação desse transcrito. Essa significativa expressão em pupas machos poderia estar prejudicando o músculo de voo desses mosquitos machos transgênicos, afetando assim o seu fitness.

As análises dos quatro primeiros genes de actina, nos mostraram que os perfis de expressão obtidos nesse trabalho eram semelhantes aos perfis de

expressão descritos na literatura, exceto para o gene AAEL001673 (AeAct-2), embora essa diferença não tenha se mostrado tão significativa.

A análise do perfil de expressão dos outros 5 genes de actina (AAEL004616, AAEL005961, AAEL005964, AAEL004631 e AAEL011197) que ainda não haviam sido relatados em estudos anteriores, se mostraram com diferenças significativas em diversos intervalos, embora presentes em todos eles. Apenas para o gene AAEL004616 o pico de indução se mostrou em larvas de quarto estadió, semelhante ao que aconteceu no perfil de expressão para o gene AAEL001673 (AeAct-2). Para todos os outros 4 genes ainda não relatados na literatura, os picos de indução se mostraram em pupas machos e fêmeas. Para nenhum gene de actina o pico de acúmulo de transcritos se mostrou na fase adulta do mosquito, uma hipótese para isso se deve ao fato da actina ser uma proteína estrutural que participa além do citoesqueleto celular, da composição muscular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2002), justificando a alta transcrição em larvas tardias e principalmente pupas, fase onde ocorre a metamorfose completa do inseto, ocorrendo nesse momento uma restauração tecidual.

Quanto ao uso dos genes de actina como controles endógenos, podemos afirmar que nenhum desses nove genes de actina poderiam ser usados como genes de referência ao longo de todo o ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Porém, quando analisamos apenas alguns intervalos ao longo do ciclo de vida do mosquito, nós observamos alguns genes de actina que podem ser usados como controles endógenos. Em larvas os genes que podem ser usados como controles endógenos são os genes AAEL005961 e AAEL005964. Em pupas os genes AeAct-1, AeAct-2, AAEL005961, AAEL005964 e AAEL004631 são os que podem ser usados como controles endógenos. E por fim, usando todos os intervalos analisados em mosquitos adultos, nós observamos que o único gene de actina que pode ser usado em todos esses intervalos como controle endógeno é o gene AeAct-4.

Todos os perfis transcricionais obtidos nesse trabalho nos mostra um panorama amplo do comportamento desses genes de actina, embora nos leve a muitas especulações quanto à função de cada actina. Um estudo mais direcionado, focando, por exemplo, a expressão tecido-específica ou o silenciamento desses genes por alguma via, poderia indicar o processo metabólico ou função de cada actina.

6 CONCLUSÃO

Os perfis de transcrição obtidos dos quatro primeiros genes de actina se mostraram coerentes com a literatura, confirmando dessa forma a eficiência e o correto uso da técnica de PCR em tempo real para a verificação de perfis transcricionais. O uso de um gene como controle endógeno para normalização do número de acúmulo de transcritos também se mostrou eficiente, devido a grande semelhança dos perfis absolutos e normalizados dos genes de actina. Os perfis de transcrição dos outros cinco genes que ainda não possuem estudos publicados e se mostraram presentes em todos os intervalos analisados, contribuirão para uma abordagem mais detalhada de tais genes. Por fim, o fato dos picos de indução de expressão de todos os genes de actina se apresentarem em pupas ou em larvas tardias nos remete a importância estrutural das actinas.

REFERÊNCIAS*

ARENSBURGER, P.; MEGY, K.; WATERHOUSE, R. M.; ABRUDAN, J.; AMEDEO, P.; ANTELO, B.; BARTHOLOMAY, L.; BIDWELL, S.; CALER, E.; CAMARA, F.; CAMPBELL, C. L.; CAMPBELL, K. S.; CASOLA, C.; CASTRO, M. T.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHAPMAN, S. B.; CHRISTLEY, S.; COSTAS, J.; EISENSTADT, E.; FESCHOTTE, C.; FRASER-LIGGETT, C.; GUIGO, R.; HAAS, B.; HAMMOND, M.; HANSSON, B. S.; HEMINGWAY, J.; HILL, S. R.; HOWARTH, C.; IGNELL, R.; KENNEDY, R. C.; KODIRA, C. D.; LOBO, N. F.; MAO, C.; MAYHEW, G.; MICHEL, K.; MORI, A.; LIU, N.; NAVEIRA, H.; NENE, V.; NGUYEN, N.; PEARSON, M. D.; PRITHAM, E. J.; PUIU, D.; QI, Y.; RANSON, H.; RIBEIRO, J. M.; ROBERSTON, H. M.; SEVERSON, D. W.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STRAUSBERG, R. L.; SUN, C.; SUTTON, G.; TU, Z. J.; TUBIO, J. M.; UNGER, M. F.; VANLANDINGHAM, D. L.; VILELLA, A. J.; WHITE, O.; WHITE, J. R.; WONDJI, C. S.; WORTMAN, J.; ZDOBNOV, E. M.; BIRREN, B.; CHRISTENSEN, B. M.; COLLINS, F. H.; CORNEL, A.; DIMOPOULOS, G.; HANNICK, L. I.; HIGGS, S.; LANZARO, G. C.; LAWSON, D.; LEE, N. H.; MUSKAVITCH, M. A.; RAIKHEL, A. S.; ATKINSON, P. W. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. **Science**, v. 330, n. 6000, p. 86-89, 2010.

BALL, E.; KARLIK, C. C.; BEALL, C. J.; SAVILLE, D. L.; SPARROW, J. C.; BULLARD, B.; FYBERG, E. A. Arthrin, a myofibrillar protein of insect flight muscle, is an actin-ubiquitin conjugate. **Cell**, v.51, p. 221–228, 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue no Brasil**. 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_aspecto_epidemiologicos_diagnostico_tratamento.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2013.

BESANSKY, N. J.; COLLINS, F. H. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. **Parasitol. Today**, v. 8, n. 6, p.186-192, 1992.

BERSTEIN, S. I.; O'DONNELL, P. T.; CRIPPS, R. M. Molecular genetic analysis of muscle development, structure, and function in *Drosophila*. **Int. Rev. Cytol.**, v. 143 p. 63–152, 1993.

BURN, T. C.; VIGOREAUX, J. O.; TOBIN, S. L. Alternative 5C actin transcripts are localized in different patterns during *Drosophila* embryogenesis. **Dev. Biol.**, v. 131, p. 345–355, 1989.

CARVALHO, D. O.; NIMMO, D.; NAISH, N.; MCKEMEY, A. R.; GRAY, P., WILKE, A. B. B. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. **J. Vis. Exp.**, v. 83, p. 35-79, 2014.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NRB 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHEN, L.; ZHU, J.; SUN, G.; RAIKHEL, A. S. The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 33, n. 3, p. 743-761, 2004

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228 p.

COURCHESNE-SMITH, G. L.; TOBIN, S. L. Tissue-specific expression of the 79B actin gene during *Drosophila* development. **Dev. Biol.**, v. 133, n. 1034, p. 313–321, 1989.

FANG, J. Ecology: a world without mosquitoes. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 432-434, 2010.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: Edusp, 2001. v. 2, 864 p.

FU, G.; LESS, R. S.; NIMMO, D.; AW, D.; JIN, L.; GRAY, P.; BERENDONK, T. U.; WHITE-CUPPER, H.; SCAIFE, S.; PHUC, G. K.; MARINOTTI, O.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A.; ALPHEY, L. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. **Pnas**, v. 302, p. 156-162, 2009.

FYRBERG, E. A.; FYBERG, C. C.; BIGGS, J. R.; SAVILLE, D.; BEALL, C. J.; KETCHUM, A. Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. **Biochem. Genet.**, v. 36, p. 271–287, 1998.

FYRBERG, E. A.; KINDLE, K. L.; DAVINSON, N.; KINDLE, K. L. The actin genes of *Drosophila*: a dispersed multigene family. **Cell**, v. 19, p. 365–378, 1980.

FYRBERG, E. A.; MAHAFFEY, J. W.; BOND, B. J.; DAVIDSON, N. Transcripts of the six *Drosophila* actin genes accumulate in a stage- and tissue-specific manner. **Cell**, v. 33, p.115–123, 1983.

GEISER, D. L.; ZHANG, D.; WINZERLING, J. J. Secreted ferritin: mosquito defense against iron overload? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 177-187, 2005.

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 319-330, 2004.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res.**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARBACH, R. E. **Mosquito Taxonomic Inventory**. Disponível em: <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>>. Acesso em: 23 fev. 2011.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591-638, 2007.

HIROMI, Y.; HOTTA, Y. Actin gene mutation in *Drosophila*: heat shock activation in the indirect flight muscle. **EMBO J.**, v. 35, n. 45, p. 1681–1687, 1985.

HOLT, R. A.; SUBRAMANIAN, G. M.; HALPERN, A.; SUTTON, G. G.; CHARLAB, R.; NUSSKERN, D. R.; WINCKER, P.; CLARK, A. G.; RIBEIRO, J. M.; WIDES, R.; SALZBERG, S. L.; LOFTUS, B.; YANDELL, M.; MAJOROS, W. H.; RUSCH, D. B.; LAI, Z.; KRAFT, C. L.; ABRIL, J. F.; ANTHOUARD, V.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BADEN, H.; DE BERARDINIS, V.; BALDWIN, D.; BENES, V.; BIEDLER, J.; BLASS, C.; BOLANOS, R.; BOSCUS, D.; BARNSTEAD, M.; CAI, S.; CENTER, A.; CHATURVERDI, K.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRYSTAL, M. A.; CLAMP, M.; CRAVCHIK, A.; CURWEN, V.; DANA, A.; DELCHER, A.; DEW, I.; EVANS, C. A.; FLANIGAN, M.; GRUNDSCHOBBER-FREIMOSER, A.; FRIEDLI, L.; GU, Z.; GUAN, P.; GUIGO, R.; HILLENMEYER, M. E.; HLADUN, S. L.; HOGAN, J. R.; HONG, Y. S.; HOOVER, J.; JAILLON, O.; KE, Z.; KODIRA, C.; KOKOZA, E.; KOUTSOS, A.; LETUNIC, I.; LEVITSKY, A.; LIANG, Y.; LIN, J. J.; LOBO, N. F.; LOPEZ, J. R.; MALEK, J. A.; MCINTOSH, T. C.; MEISTER, S.; MILLER, J.; MOBARRY, C.; MONGIN, E.; MURPHY, S. D.; O'BROCHTA, D. A.; PFANNKOCH, C.; QI, R.; REGIER, M. A.; REMINGTON, K.; SHAO, H.; SHARAKHOVA, M. V.; SITTER, C. D.; SHETTY, J.; SMITH, T. J.; STRONG, R.; SUN, J.; THOMASOVA, D.; TON, L. Q.; TOPALIS, P.; TU, Z.; UNGER, M. F.; WALENZ, B.; WANG, A.; WANG, J.; WANG, M.; WANG, X.; WOODFORD, K. J.; WORTMAN, J. R.; WU, M.; YAO, A.; ZDOBNOV, E. M.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHAO, S.; ZHU, S. C.; ZHIMULEV, I.; COLUZZI, M.; DELLA TORRE, A.; ROTH, C. W.; LOUIS, C.; KALUSH, F.; MURAL, R. J.; MYERS, E. W.; ADAMS, M. D.; SMITH, H. O.; BRODER, S.; GARDNER, M. J.; FRASER, C. M.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BREY, P. T.; VENTER, J.C.; WEISSENBAACH, J.; KAFATOS, F. C.; COLLINS, F. H.; HOFFMAN, S. L. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 298, n. 5591, p.129-149, 2002.

IBRAIHM, M. S.; EISINGER, S. W.; SCOTT, A. L. Muscle actin gene from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 33, n. 71, p. 955–962, 1996.

JAMES, A. A. Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 2, p. 64-67, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. v. 5, p.72-75.

KELLER, C. A.; ERYCSON, M. S.; ABMAYR, S. M. Misexpression of nautilus induces myogenesis in cardioblasts and alters the pattern of somatic muscle fibers. **Dev Biol.**, v. 171, n. 209, p. 197–212, 1997.

LODISH, A. H.; BERK, S. L.; ZIPURSKIS, P.; MATSUDAIRA, D. **Molecular cell biology**. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2000. v. 3, p. 86-91.

MEGY, K.; HAMMOND, M.; LAWSON, D.; BRUGGNER, R. V.; BIRNEY, E.; COLLINS, F. H. Genomic resources for invertebrate vectors of human pathogens, and the role of VectorBase. **Infect. Genet. Evol.**, v. 9, n. 3, p. 308-313, 2009.

MOUNIER, N.; SPARROW, J. C. Muscle actin genes in insects. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 105, p. 231–238, 1993.

MUNÓZ, D.; JIMENEZ, A.; MARINOTTI, O. The AeAct-4 gene is expressed in the developing flight muscles of female *Aedes Aegypti*. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 71, p. 563-568, 2004.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, p. 205-207, 2002.

NENE, V.; WORTMAN, J. R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C.; TU, Z. J.; LOFTUS, B.; XI, Z.; MEGY, K.; GRABHERR, M.; REN, Q.; ZDOBNOV, E. M.; LOBO, N. F.; CAMPBELL, K. S.; BROWN, S. E.; BONALDO, M. F.; ZHU, J.; SINKINS, S. P.; HOGENKAMP, D. G.; AMEDEO, P.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BIDWELL, S.; BIEDLER, J.; BIRNEY, E.; BRUGGNER, R. V.; COSTAS, J.; COY, M. R.; CRABTREE, J.; CRAWFORD, M.; DEBRUYN, B.; DECAPRIO, D.; EIGLMEIER, K.; EISENSTADT, E.; EL-DORRY, H.; GELBART, W. M.; GOMES, S. L.; HAMMOND, M.; HANNICK, L. I.; HOGAN, J. R.; HOLMES, M. H.; JAFFE, D.; JOHNSTON, J. S.; KENNEDY, R. C.; KOO, H.; KRAVITZ, S.; KRIVENTSEVA, E. V.; KULP, D.; LABUTTI, K.; LEE, E.; LI, S.; LOVIN, D. D.; MAO, C.; MAUCELI, E.; MENCK, C. F.; MILLER, J. R.; MONTGOMERY, P.; MORI, A.; NASCIMENTO, A. L.; NAVEIRA, H. F.; NUSBAUM, C.; O'LEARY, S.; ORVIS, J.; PERTEA, M.; QUESNEVILLE, H.; REIDENBACH, K. R.; ROGERS, Y. H.; ROTH, C. W.; SCHNEIDER, J. R.; SCHATZ, M.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STINSON, E. O.; TUBIO, J. M.; VANZEE, J. P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WERNER, D.; WHITE, O.; WYDER, S.; ZENG, Q.; ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; HILL, C. A.; RAIKHEL, A. S.; SOARES, M. B.; KNUDSON, D. L.; LEE, N. H.; GALAGAN, J.; SALZBERG, S. L.; PAULSEN, I. T.; DIMOPOULOS, G.; COLLINS, F. H.; BIRREN, B. FRASER-LIGGETT, C. M.; SEVERSON, D. W. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.

REY, L. **Bases de parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 379 p.

REY, L. **Bases de parasitologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 394 p.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol.**, v. 132, p. 365-386, 2000.

SALAZAR, C. E.; HAMM, D. M.; WESSON, D. M.; BEARD, C. B.; KUMAR, V. COLLINS, F. H. A cytoskeletal actin gene in the mosquito. *Anopheles gambiae*. **Insect Mol Biol.**, v. 3, p. 1–13, 1994.

SALVEMINI, M.; MAURO, U.; LOMBARDO, F.; MILANO, A.; ZAZZARO, V.; ARCÁ, B.; POLITO, L. C.; SACCONI, G. Genomic organization and splicing evolution of the doublesex gene, a *Drosophila* regulation of sexual differentiation, in the dengue and yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 241, p. 147-163, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001. Suppl.

TOBIN, S. L.; ZULAUF, E.; SANCHEZ, F.; CRAIG, E. A.; MCCARTHY, B. J. Multiple actin-related sequences in the *Drosophila melanogaster* genome. **Cell**, v. 34, p. 121-131, 1994.

TOBIN, S. L.; COOK, P. J.; BURN, T. C. Transcripts of individual *Drosophila* actin genes are differentially distributed during embryogenesis. **Dev. Genet.**, v. 11, p. 15-26, 1990.

WATERHOUSE, R. M.; WYDER, S.; ZDOBNOV, E. M. The *Aedes aegypti* genome: a comparative perspective. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2008.

VANDEKERCKHOVE, J.; WEBER, K. Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, p. 1106-1110, 1978.

VYAZUNOVA, I.; LAN, Q. Stage-specific expression of two actin genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **The Royal Entomological Society, Insect Molecular Biology**, v. 13, p. 141-249, 2004.